



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIO CESAR CENCI DE AGUIAR

SISTEMÁTICA DE DACTILOGIRÍDEOS (PLATYHELMINTHES,
MONOGENOIDEA) PARASITAS DE PEIXES DA FAMÍLIA
PIMELODIDAE DAS BACIAS DOS RIOS AMAZONAS E PARANÁ,
BRASIL

SYSTEMATICS OF DACTYLOGYRIDS (PLATYHELMINTHES,
MONOGENOIDEA) PARASITES OF FISHES OF THE FAMILY
PIMELODIDAE FROM THE AMAZON AND PARANA RIVERS
BASINS, BRAZIL

CAMPINAS

2017

JULIO CESAR CENCI DE AGUIAR

**SISTEMÁTICA DE DACTILOGIRÍDEOS (PLATYHELMINTHES,
MONOGENOIDEA) PARASITAS DE PEIXES DA FAMÍLIA
PIMELODIDAE DAS BACIAS DOS RIOS AMAZONAS E PARANÁ,
BRASIL**

**SYSTEMATICS OF DACTYLOGYRIDS (PLATYHELMINTHES,
MONOGENOIDEA) PARASITES OF FISHES OF THE FAMILY
PIMELODIDAE FROM THE AMAZON AND PARANA RIVERS BASINS,
BRAZIL**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do Título de
Doutor em Biologia Animal, na área de
concentração em Relações Antrópicas, Meio
Ambiente e Parasitologia.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of the
University of Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of PhD in Animal
Biology, in the area of concentration in Anthropic
Relations, Environment and Parasitology.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO JULIO CESAR CENCI DE AGUIAR E
ORIENTADA PELO PROF. DR. EDSON
APARECIDO ADRIANO.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Domingues

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/20770-5

ORCID: <http://orcid.org/http://orcid.org/00>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Ag93s Aguiar, Julio Cesar Cenci, 1982-
Sistemática de dactilogirídeos (Platyhelminthes, Monogenoidea) parasitas de peixes da família Pimelodidae das bacias dos rios Amazonas e Paraná, Brasil / Julio Cesar Cenci de Aguiar. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Edson Aparecido Adriano.

Coorientador: Marcus Vinicius Domingues.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Biodiversidade - América Latina. 2. Bagre (Peixe). 3. Dactylogyridae. 4. Filogenia. I. Adriano, Edson Aparecido. II. Domingues, Marcus Vinicius. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Systematics of dactylogyrids (Platyhelminthes, Monogenoidea) parasites of fishes of the family Pimelodidae from the Amazon and Parana rivers basins, Brazil

Palavras-chave em inglês:

Biodiversity - Latin America

Catfishes

Dactylogyridae

Phylogeny

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Doutor em Biologia Animal

Banca examinadora:

Edson Aparecido Adriano [Orientador]

Marlene Tiduko Ueta

Maria Isabel Muller

Ricardo Massato Takemoto

Silmara Marques Allegretti

Data de defesa: 28-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Campinas, 28 de agosto de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano (presidente)

Profa. Dra. Maria Isabel Müller

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta

Prof. Dr. Ricardo Massato Takemoto

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Um dia depusitei no Universo o desejo de produzir
essa tese... e ele me ofereceu todas as condições.
Agora, eu a ofereço de volta...

Dedico aos meus professores.

AGRADECIMENTOS

Produzir essa tese foi algo extremamente gratificante. Durante esse período amadureci e evolui, como espírito, pessoa e profissional que sou, embora eu saiba que ainda tenho muito o que aprender. E me lembro exatamente cada lugar, cada acontecimento, cada aproximação, cada abordagem, cada olhar, cada frustração, cada sucesso e claro, cada prazo que se apresentou diante de mim. De modo que eu poderia encerrar por aqui, não fosse a enorme gratidão que sinto por tudo isso...por ter vivenciado tudo que vivenciei nesse período e, por ter agora a oportunidade de agradecer.

Quando mais jovem, no ensino médio comprei meu primeiro livro...um livro de biologia geral, o qual aproveitei para me aprofundar no estudo das leis de Mendel, muito bem ensinadas pelo meu amigo João Paulo, o que me parecia a única coisa a fazer sentido em biologia naquela época. Neste período eu nem imaginava que estudaria biologia, eu simplesmente vivia...e trabalhava muito...na peixaria São Sebastião, do senhor Sebastião Morgado, em Caçapava, no Vale do Paraíba. Sebastião era muuuuuuito rigoroso, mas ali aprendi a ser profissional, a reconhecer diferentes formas de peixes, a observar parasitas em suas “barrigadas” e “carne” e a compreender que “*enquanto descansa, carrega a pedra*” (sic), como dizia incansavelmente, o Sr. Sebastião.

Concluído o ensino médio, iniciei um estudo técnico em mecânica na Etec João Gomes de Araújo de Pindamonhangaba. Logo no primeiro dia um desafio provocado pelo professor Venâncio na disciplina de “Elementos de Materiais”: resolver um problema de física sem nenhuma fórmula...apenas compreendendo a física. Nesse momento, despertava em mim a vontade de entender sobre os fenômenos, em vez de decorá-los para tirar uma boa nota. E foi também graças a esse curso, que me empenhei no aprendizado de desenho técnico, vindo posteriormente a me desenvolver no uso do AUTOCAD. Mas também não posso deixar de me lembrar, que foi graças a esse curso, que consegui um estágio na metalúrgica Aços Villares, em Pindamonhangaba.

Na Villares trabalhei com o engenheiro Tulio Gabriel Felipe Vasquez Figueiroa, um sujeito ***bastante*** rigoroso, no setor de Manutenção Preventiva Total e Plano de Sugestões. Era muito prazeroso ver os colaboradores serem reconhecidos por suas ideias e sou grato às pessoas que ali conheci, e às oportunidades que tive ali, pois nessa empresa que aprendi a enxergar problemas e propor soluções.

Ao final do estágio na Villares, não fui efetivado e talvez eu não tivesse que ser, pois tinha uma oportunidade para trabalhar nos pedágios da Dersa S/A nas rodovias Carvalho Pinto e Ayrton Senna, onde estavam muitos dos meus amigos de infância e adolescência. Contudo ali conheci novos amigos...em especial o Ju, o Reges, o Frank e o Moura Neto, com os quais comecei a aprender a surfar. E graças a esse *hobby*, íamos para as praias de Ubatuba quase toda semana. E foi na prática do surfe, que comecei a fazer minhas primeiras observações da natureza...a perguntar-me por que...determinadas espécies surgiam em determinadas épocas...por que águas vivas queimavam nossa pele...por que alguns organismos vivem na praia, outros nos costões, outros no fundo do mar e outros na coluna d'água? Enfim...uma infinidade de perguntas que só poderiam ser respondidas por especialistas da área...os biólogos!

De lá para cá, o Universo só fez conspirar a meu favor. As habilidades me foram dadas e só fiz aprimorá-las, mas não sem contar com a ajuda de inúmeras pessoas...e que bom que ao longo do caminho, encontramos amigos. Infelizmente não posso enumerá-los todos, mas sintam, por favor, a gratidão que dispenso a todos que um dia cruzaram meu caminho.

Da Universidade de Taubaté – UNITAU, um agradecimento a todos os amigos, corpo docente e funcionários. Mas um agradecimento muito especial ao professor Dr. Silvio Simões e a professora Dr. Sonia Maria Cursino dos Santos. O professor Silvio era áspero ao dizer, sempre que perguntado sobre alguma coisa de anatomia...”*pegue a literatura, busquem a literatura*” e a Sonia, com seu jeito pouco delicado, que me faz lembrar os acúleos de uma rosa, foram grandes mestres, amigos e incentivadores de minha carreira acadêmica. Meu muito obrigado à vocês!

Da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, agradeço aos amigos do alojamento, do laboratório de Parasitologia de Peixes coordenado pelo professor Dr. Jose Luis Luque e aos professores e funcionários da instituição. Em especial ao professor Dr. Wagner Tassinari pela maneira como conduziu o ensino em bioestatística e ao professor Luque, ao qual coube a difícil tarefa de me lapidar, mas que com seu rigor científico, pode proporcionar-me a visão e disciplina necessárias para o desenvolvimento acadêmico.

Do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo – IB/USP, agradeço enormemente ao professor Dr. Fernando Portella de Luna Marques. Tentamos desenvolver juntos uma tese de doutorado, que não foi aprovada pelo sistema de seleção da Zoologia. Contudo aprendi com Fernando, a escrever. Na verdade ainda não sei muito bem...mas o que sei foi graças a esse professor.

Do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental – CEPTA/ICMBio/MMA há uma lista imensa de pessoas, e fica até difícil aqui agradecer a todas. Vivi ali um período bastante intenso de desenvolvimento profissional e autoconhecimento. Começo agradecendo ao grande mestre, amigo e co-orientador Dr. Paulo Ceccarelli, pelas inúmeras oportunidades e ensinamentos. Ao Laerte Batista de Oliveira Alves e ao Dr. José Augusto Senhorini, pela oportunidade, por proporcionar a estrutura necessária para o desenvolvimento dessa tese, e sobretudo, pelo carinho e amizade. Aos técnicos e amigos Ricardo Afonso Torres de Oliveira e Arlindo Donizete Lançoni, sempre muito solícitos, interessados em ajudar nos trabalhos de campo, em laboratório, mas principalmente pela fraternidade que nos envolveu. Ao Dr. George Shigueki Yasui, pela estrutura laboratorial, pelas sugestões de desenvolvimento de estudos de base e pela amizade e carinho. Ao Dr. Leonardo Calado pelas ideias e conversas científicas e pela amizade. A todos os analistas ambientais, em especial ao Antonio Fernando Bruni Lucas, Saulo dos Reis, Carla Natacha Marcolino Polaz, Claudio Luiz Bock, Izabel Corrêa Boock de Garcia, José Sávio Colares de Melo, Luís Alberto Gaspar, Maria Rita de Cáscia Barreto Netto, Osmar Angelo Cantelmo, Rita de Cássia Gimenes de Alcantara Rocha, Rogério René Garcia Machado, Sandoval dos Santos Júnior; a todos os técnicos, em especial ao Tim (Benedito Aparecido Correa), Daltão (Dalton Donizetti Machado), Noel (Noel Donizetti Martins), Jairão (Jairo Aparecido de Oliveira) e Vera Élen Nascimento Freitas; a todos alunos, mas especialmente ao José Octávio de Lima Pereira, Willlian Silva, Willlliam Silva Oliveira e Arthur de Lima Pereira; e aos amigos Lucia, Dilberto, Rafa, Larica, Piva, Victor, Tata Mira, Nycolas, Fernando, Alan e tantos outros, que de alguma maneira proporcionaram imensurável apoio em trabalhos de campo e/ou, pelo fornecimento de estrutura laboratorial, alojamento, mas que certamente foram e são grandes amigos.

Da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP – FZEA/USP, agradeço a todos os professores e técnicos do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD/ZMV). Agradeço especialmente ao professor Dr. Antônio Augusto Mendes Maia e à Dra. Márcia Ramos Monteiro da Silva do Laboratório de Parasitologia e Imunologia de Parasitas, pela co-orientação, estrutura fornecida, pela paciência, confiança, por insistirem no ensino de ciência de base e por serem essas pessoas lindas que são. Agradeço aos amigos do mesmo laboratório, Mateus, Gabriel, Elayna, Kassia, Curió, Josi, Titi e Juju, pela enorme contribuição ao meu

aprendizado em Biologia Molecular, pela paciência, pelas elucubrações, pelos trabalhos de campo, pelo entusiasmo e pelas reuniões regadas a alegria, boa comida, vinhos e cervejas.

Da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, agradeço ao Dr. Lincoln Lima Corrêa pela contribuição nos trabalhos de campo e amizade, bem como ao seu sábio e entusiasta sogro Sr. Antonio.

Da Universidade do Estado de São Paulo – UNESP, agradeço ao Dr. Ricardo Britzke, grande amigo, e por contribuir na identificação dos peixes examinados no presente estudo.

Agradeço aos Dr. Marcelo Knoff, curador da Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Dr. Célio Magalhães da Coleção de Invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônica (INPA), por gentilmente nos enviar os espécimes examinados para fins comparativos no presente estudo.

Da Coleção de Parasitologia do National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, agradeço à Dra. Anna J. Phillips, por providenciar toda estrutura necessária para análise de um importante acervo de espécimes tipos de parasitas de peixes neotropicais.

Do Instituto de Estudos Costeiro da Universidade Federal do Pará – IECOS/UFPA, agradeço aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Naturais (FACIN), em especial ao professor Dr. Marcus Vinícius Domingues pela co-orientação, importantíssima para compreensão e diagnose de estruturas de monogenóideos e pelas revisões do meu texto, mas principalmente pelo carinho e amizade. Agradeço pela ajuda em laboratório e pelo carinho, aos amigos Ivan, Barbie, Laís, Allan, Karen, Nayna, João e Jéssica.

Agradeço também aqueles que foram fundamentais para o desenvolvimento dessa tese. Ao professor Dr. Edson Aparecido Adriano da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. O Edson comprou uma ideia, talvez até um sonho de realizar esse estudo, em meados de 2011, durante uma viagem à Itaituba, no rio Tapajós, quando conversamos sobre essa possibilidade pela primeira vez. Sou muito grato a você por ter confiado e ter dado todo o apoio necessário para que essa tese fosse o que é hoje, mesmo sabendo que muitas vezes estávamos correndo contra os prazos. Obrigado professor!

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP e a todos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, especialmente as professoras Dra. Silmara Marques Allegretti, Dra. Marlene Tiduko Ueta, Dra. Regina Maura Bueno Franco e aos secretários

(a) Marco Antônio, Flávio Inácio e Silvia Helena, por me fornecerem respostas para minhas perguntas, e/ou estrutura laboratorial e direcionamento científico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, que pela bolsa de doutorado conferida a mim (FAPESP Proc. No. 2013/20770-5) e pelo projeto contemplado ao professor Edson Aparecido Adriano (FAPESP Proc. No. 2013/21374-6), proporcionou o fomento necessário para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Finalmente, agradeço aqueles que representam toda minha força e estrutura: mãe (Carmen), pai (Luiz), irmãs (Marcela e Carolina), Kelly, família e amigos...

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.” – Bertrand Russell

“(…) Me recordei rapidamente de todas as pessoas e coisas que perdi por ainda não estar preparada para elas, ou por ainda ter muita curiosidade de mundo e dificuldade em ser permanente...Recordei de amigos e parentes distantes, aqueles que eu sempre deixo para depois porque moram muito longe ou acabaram se tornando pessoas muito diferentes de mim, sempre penso “mês que vem faço contato com eles”. E se não tiver mês que vem? ...” – Tati Bernardi

“(…) “Um inconsciente preconceito teológico apresentou-se também: o que confunde ignorância com fé. Frequentemente se olvida que Deus, se nos cercou deste perene mistério evolutivo da criação, implantou em nós também o desejo de perguntar e de entender. Incompreendido pelos outros durante muitos anos, vim a saber que a vida de um devoto à ciência está inevitavelmente repleta de esforços intermináveis. Cabe a ele fazer o lance de sua vida como ardente oferenda – encarando perda e ganho, sucesso e fracasso, como um só evento....” – trecho do discurso de Jâgadis Chandra Bose extraído do livro “Autobiografia de um Iogue” de Paramahansa Yogananda

RESUMO

Dactilogirídeos (Monogenoidea) provavelmente representam o grupo de helmintos com a maior diversidade e abundância do planeta. A partir disso, reconhecer essa diversidade e compreender as histórias evolutivas que os moldaram e os conduziram a um processo de radiação adaptativa é um desafio atual. Esses parasitas obtiveram seu maior sucesso associado aos peixes de água doce, aos quais, o parasitismo eventualmente podem incidir em doenças e até induzir à morte. Na região Neotropical, habitat da mais rica fauna de peixes de água doce do mundo, os dactilogirídeos não estão uniformemente associados a esses peixes, mas estão melhor representados junto aos hospedeiros caraciformes (54% da diversidade de Dactylogyridae), siluriformes (24%) e perciformes (14%). Os maiores avanços no conhecimento dessa diversidade de dactilogirídeos se deu na década de 1960, mas é ainda caracterizado como incipiente, principalmente em relação à sistemática filogenética. Assim, há indícios de que menos do que 5% da diversidade de dactilogirídeos foi revelada para a região Neotropical, resultado da escassez de estudos para muitos hospedeiros. Nos últimos anos, os dactilogirídeos parasitas de siluriformes da região Neotropical vêm recebendo maior atenção e algumas dezenas de espécies foram descritas na última década. Esse sistema parasita-hospedeiro vem sendo considerado um modelo interessante para inferir hipóteses biogeográficas e sobre co-evolução. Porém, um mínimo de conhecimento sobre o relacionamento entre os clados é necessário para avançar nessa temática. O presente estudo traz resultados que permitem avanços na compreensão das relações evolutivas dentro de Dactylogyridae, os quais foram obtidos a partir de estudos de sistemática filogenética de dactilogirídeos parasitas de peixes pimelodídeos das bacias dos rios Amazonas e Paraná, Brasil. As inferências filogenéticas com base em dados moleculares realizadas foram potencializadas pelo desenvolvimento de novos primers e os resultados obtidos são apresentados nesta tese em três capítulos: o primeiro capítulo trata da descrição de uma nova espécie de *Pavanelliella* parasita de *Brachyplatystoma rousseauxii*, e o sequenciamento do 18S rDNA parcial e ITS1 corrobora a monofilia do gênero; O segundo capítulo é dedicado à descrição de uma nova espécie de *Ameloblastella* parasita de *Phractocephalus hemioliopterus*, e por meio do sequenciamento das regiões D1 – D3 do 28S rDNA, foi sugerida uma hipótese de relacionamento filogenético para dactilogirídeos; o terceiro capítulo foi fortemente baseado no estudo de dactilogirídeos parasitas de *P. hemioliopterus* da bacia do rio Amazonas, mas também de *Hoplias malabaricus* e *Pimelodus*

maculatus da bacia do rio Paraná. Neste capítulo foi descrita uma nova espécie de *Demidospermus*; duas espécies anteriormente consideradas *incertae sedis* foram transferidas para este gênero; e foi proposto um novo gênero. Todas as propostas realizadas no terceiro capítulo foram suportadas por meio de inferência filogenética com base no sequenciamento total do 18S rDNA. Os resultados alcançados durante o desenvolvimento desta tese permitiram compreender parcialmente a complexa história evolutiva de dactilogirídeos, a qual pode envolver inúmeros eventos de colonização secundária do ambiente marinho, e reinvasões de ambientes de água doce, além de colonizações independentes de hospedeiros filogeneticamente próximos a partir de hospedeiros filogeneticamente distantes.

Palavras-chave: Região Neotropical, Biodiversidade, Siluriformes, Dactylogyridae, Filogenia

ABSTRACT

Dactylogyrids (Monogeneoidea) probably represent the helminth group with largest diversity and abundance on the planet. Therefore, recognizing this diversity and understanding the evolutionary histories that shaped and led them to an adaptive radiation process is a current challenge. These parasites had their greatest success associated with freshwater fish, in which could eventually lead to disease and even induce host death. In the Neotropical region, habitat of the richest freshwater fish fauna in the world, dactylogyrids are not uniformly associated with these fishes, but best represented by the association to characiform hosts (54% of the diversity of Dactylogyridae), siluriform (24%) and perciform (14%). The greatest advances in the knowledge of this diversity of dactylogyrids occurred in the 1960s, but it is still characterized as incipient, mainly in relation to phylogenetic systematics. Thus, there are indications that less than 5% of this dactylogyrid diversity has been revealed for the Neotropical region, and this is result of the paucity of studies for many hosts species. In recent years, the parasitic dactylogyrids of siluriform from the Neotropical region have been receiving more attention and some dozens of species have been described in the last decade. This parasite-host system has been considered as an interesting model to infer biogeographic hypotheses and co-evolution. However, to advance in this theme is necessary to have a minimum of knowledge about the relationship among the lineages. The present study provides results that allow advances in the understanding of evolutionary relationships within Dactylogyridae. These data were based on studies of phylogenetic systematics of parasitic dactylogyrids of pimelodid fish from the Amazon and Parana rivers basins, Brazil. The molecular phylogenetic inferences were potentiated by the development of new primers and the results obtained are presented in three chapters: the first chapter provides the description of a new species of *Pavanelliella* found parasitizing *Brachyplatystoma rousseauxii*, and based on the sequencing of the 18S partial rDNA and ITS1 corroborated the monophyly of the genus; the second chapter provides the description of a new species of *Ameloblastella* parasitizing *Phractocephalus hemioliopus* and based on the sequencing of the D1-D3 regions of 28S rDNA, has been proposed a hypothesis of phylogenetic relationship for dactylogirids; the third chapter was strongly based on the study of parasitic dactylogirids of *P. hemioliopus* from Amazon river basin, but also of *Hoplias malabaricus* and *Pimelodus maculatus* from Parana River basin. In this chapter, was described one species of *Demidospermus*, two species previously considered *incertae sedis* were

transferred to this genus and the erection of a new genus was proposed. All proposals of the third chapter were supported by phylogenetic inference based on the complete 18S rDNA sequencing. The results obtained during the development of this thesis allowed to understand partially the complex evolutionary history of dactylogyrids, which may involve numerous events of secondary colonization of the marine environment, and reinvasions of freshwater environments, in addition to independent colonizations of phylogenetically close hosts from phylogenetically distant hosts.

Keywords: Neotropical Region, Biodiversity, Siluriformes, Dactylogyridae, Phylogeny

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Número acumulado de espécies de monogenóideos parasitas de peixes (A) e de dactilogirídeos parasitas de siluriformes (B) descritos por ano na América do Sul.....	23
Figura 2 Propostas filogenéticas moleculares para Dactylogyridae (redesenhadas a partir das propostas originais).	25
Figura 3 Pontos de coleta na bacia do rio Tapajós, Estado do Pará, e na bacia do rio Paraná, Estado de São Paulo, Brasil.....	29
Figura 4 Peixes do rio Tapajós examinados no presente estudo. A <i>Phractocephalus hemioliopus</i> B <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> C <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> D <i>Zungaro zungaro</i> E <i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	31
Figura 5 Peixes adicionais examinados no presente estudo para coleta de <i>Pavanelliella</i> , <i>Demidospermus</i> e <i>Urocleidoides</i> . A <i>Pimelodus maculatus</i> B <i>Pimelodus microstoma</i> C <i>Hoplias malabaricus</i>	32
Figura 6 Mensuração do órgão copulador masculino (OCM).....	34
Figure 7 <i>Pavanelliella</i> sp. n.	61
Figure 8 <i>Pavanelliella pavanellii</i> parasite of: <i>Pimelodus maculatus</i> . <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> . <i>Pseudoplatystoma tigrinum</i> . <i>Zungaro zungaro</i>	62
Figure 9 <i>Pavanelliella</i> sp. n.. A: copulatory complex in ventral view (PTJ1413-3). B: dorsal view. C: vagina (PTJ1412-4). D: hook (PTJ1414-2). <i>Pavanelliella takemotoi</i> . E: copulatory complex in lateral view (CHIOC37571). F: dorsal view (CHIOC37576b). G: vagina in dorsal view (CHIOC37582b). H: vagina in ventral view. I: hook. <i>Pavanelliella laertei</i> . J: copulatory complex in ventral view (CHIOC37563). K: dorsal view. L: vagina in ventral view (CHIOC37562). M: vagina in dorsal view. N: vagina (CHIOC37566). O: vagina (PMG1202). P: hook (CHIOC37564).	63
Figure 10 Phylogenetic reconstruction of <i>Pavanelliella</i> spp. based on SSU rDNA partial and ITS1 gene sequence.	66
Figura 11 <i>Ameloblastella</i> sp. n.	86
Figura 12 <i>Ameloblastella</i> sp. n. parasita de brânquias de <i>Phractocephalus hemioliopus</i> , da bacia do rio Tapajós, Pará, Brasil.	87
Figura 13 Reconstrução filogenética de <i>Ameloblastella</i> sp. n. baseada no gene 28S rDNA. Árvore gerada por meio de Máxima Verossimilhança (ML).....	90
Figura 14 <i>Demidospermus amazonensis</i> n. comb. parasita de <i>Phractocephalus hemioliopus</i> , proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil	104
Figura 15 <i>Demidospermus amazonensis</i> n. comb. parasita de <i>Phractocephalus hemioliopus</i> proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil..	105
Figura 16 <i>Demidospermus catus</i> n. comb. parasita de <i>Phractocephalus hemioliopus</i> , proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil.	108

Figura 17 <i>Demidospermus catus</i> n. comb. parasita de <i>Phractocephalus hemioliopterus</i> proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil..	109
Figura 18 <i>Demidospermus</i> sp. n. parasita de <i>Phractocephalus hemioliopterus</i> , proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil.	113
Figura 19 <i>Demidospermus</i> sp. n. parasita de <i>Phractocephalus hemioliopterus</i> , proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil.	114
Figura 20 <i>Vancleaveus cicinnus</i> parasita de <i>Phractocephalus hemioliopterus</i> , proveniente do rio Tapajós, Pará, Brasil.	117
Figura 21 <i>Unibarra paranoplatensis</i> parasita de <i>Zungaro zungaro</i> (B, C) e <i>Phractocephalus hemioliopterus</i> (A, D, E e F), da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil.	120
Figura 22 Gen. n. sp. n. parasita de <i>Phractocephalus hemioliopterus</i> , proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil.	125
Figura 23 Gen. n. sp. n. parasita de <i>Phractocephalus hemioliopterus</i> , proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil.	126
Figura 24 Árvore de consenso de maioria, como sugerida pela Inferência Baiesiana (BI) com base no sequenciamento do gene 18S rDNA.	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Espécies de peixes, com comprimento e peso médio \pm desvio padrão (DP), localidade de coleta e número de peixes examinados (N), durante este estudo para diagnose de monogenóideos.	30
Tabela 2 Measurements (μm) and epidemiologic data about <i>Pavanelliella</i> species, parasites of catfish from Brazil.	60
Tabela 3 Estimates of evolutionary divergence between four sequences of ssrDNA partial and ITS-1 of three species of <i>Pavanelliella</i>	64
Tabela 4 Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências parcial do gene 28S rDNA de seis espécies de <i>Ameloblastella</i>	88
Tabela 5 Tamanho e posição relativa das sequências de 18S rDNA obtidas no presente estudo	127

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	16
LISTA DE TABELAS	18
SUMÁRIO	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Justificativa	26
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Locais de coleta e de depósito dos hospedeiros	27
3.2. Coleta, processamento e análise dos parasitas	28
3.3. Análises morfológicas	33
3.4. Análises moleculares	34
3.5. Inferências filogenéticas	35
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
5. RESULTADOS	47
6. CAPÍTULO 1. AN INTEGRATIVE TAXONOMIC STUDY OF PAVANELLELLA SPP. (MONOGENOIDEA, DACTYLOGYRIDAE) WITH THE DESCRIPTION OF A NEW SPECIES FROM THE NASAL CAVITIES OF AN AMAZON PIMELODID CATFISH	48
6.1. INTRODUCTION	50
6.2. MATERIAL AND METHODS	51
6.2.1. Morphological study of the helminths	51
6.2.2. Molecular analysis of the parasites	51
6.2.3. Phylogenetic inference	51
6.3. RESULTS	52
6.3.1. Quantitative descriptors of Pavanelliella spp. from the nasal cavities of pimelodid catfishes	52
6.3.2. Morphological and molecular taxonomy	52
6.3.4. Phylogenetic inference	64
6.4. DISCUSSION	67
6.5. REFERENCES	70

7. CAPÍTULO 2. INFERÊNCIA FILOGENÉTICA DE AMELOBLASTELLA SP. N. (MONOGENOIDEA, DACTYLOGYRIDAE), PARASITA DE PHRACTOCEPHALUS HEMIOLIOPTERUS DA BACIA DO RIO TAPAJÓS, BRASIL	79
7.1. INTRODUÇÃO	80
7.2. MATERIAL E MÉTODOS	81
7.2.1. Análises moleculares.....	81
7.2.2. Inferência filogenética.....	81
7.3. RESULTADOS.....	82
7.3.1. Taxonomia morfológica e molecular	82
7.3.2. Inferência filogenética.....	88
7.4. DISCUSSÃO.....	91
7.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
8. CAPÍTULO 3. SISTEMÁTICA MOLECULAR BASEADA NO GENE 18S RDNA SUPORTA A PROPOSTA DE UM NOVO GÊNERO E UMA NOVA COMBINAÇÃO PARA DACTILOGIRÍDEOS (MONOGENOIDEA) PARASITAS DE SILURIFORMES NA AMÉRICA DO SUL	97
8.1. INTRODUÇÃO	98
8.2. MATERIAL E MÉTODOS	99
8.3. RESULTADOS.....	100
8.3.1. Taxonomia morfológica	100
8.3.2. Caracterização das sequências de 18S rDNA.....	127
8.3.3. Hipótese filogenética.....	127
8.4. DISCUSSÃO.....	131
8.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143
10. CONCLUSÕES.....	144
11. ANEXOS.....	145

1. INTRODUÇÃO

Monogenóideos são platelmintos hermafroditas com ciclo de vida direto, majoritariamente ectoparasitas de vertebrados, principalmente peixes, e que apresentam na região posterior do corpo, um órgão de fixação (*i.e.* haptor) composto por diferentes combinações de ganchos, barras, âncoras e grampos (Littlewood, 2006; Roberts e Janovy Jr, 2009). Correspondem a um grupo monofilético, resultante de uma radiação adaptativa (Brooks e McLennan, 1993; Rohde, 1996; Boeger e Kritsky, 2001; Littlewood e Olson, 2001; Littlewood, 2006), que permitiu a esses organismos ocuparem diferentes habitats (*i. e.* terrestre, água doce, estuário, marinho) e colonizarem hospedeiros de diferentes grupos taxonômicos (*e. g.* cefalópodes, isópodes, peixes, anfíbios, quelônios até mamíferos - hipopótamo), parasitando órgãos externos (*i. e.* pele, nadadeira, narina, brânquias e canais mandibulares) e internos (*i. e.* esôfago, estômago, bexiga urinária, sistema renal) (Bychowsky, 1961; Boeger e Vianna, 2006; Héritier *et al.*, 2015).

Entre os grupos de metazoários com representantes parasitas, Monogenoidea corresponde a um dos mais diversos do planeta, abrangendo 24% das espécies (Acari: 29%; Trematoda+Cestoda: 14%; Nematoda: 10%) (Poulin e Morand, 2004). Estimativas globais da diversidade de Monogenoidea sugerem que existem entre 20.000–25.000 espécies, das quais conhecemos menos do que 20% (Rohde, 1996; Whittington, 1998), e talvez menos ainda nas regiões tropicais do mundo (Poulin, 2002). Os primeiros relatos sobre monogenóideos na região Neotropical datam do século XIX, porém somente a partir da década de 60 do século XX se intensificaram os registros desses parasitas em hospedeiros provenientes da bacia Amazônica mantidos em aquários, principalmente de museus dos Estados Unidos (Boeger e Vianna, 2006; Cohen *et al.*, 2013) (Figura 1). Desde então, em todo continente sul-americano foram registradas 673 espécies, das quais 96% correspondem a parasitas de peixes.

Na América do Sul, a maioria dos monogenóideos parasitas de peixes conhecidos são provenientes de ambientes de água doce (*i. e.* riachos, rios, lagos, lagoas). Essa estrutura deve-se principalmente à contribuição dada pela riqueza da família Dactylogyridae Bychowsky, 1933, que é de longe a mais especiosa do continente e provavelmente de todo planeta. Dactilogirídeos são primariamente parasitas de peixes de água doce (Bychowsky, 1961) e parte dessa megadiversidade está relacionada à diversidade dos hospedeiros colonizados por esses organismos.

Peixes correspondem a mais da metade de todas as espécies de vertebrados conhecidas no mundo (Nelson *et al.*, 2016) e nos ambientes de água doce da América do Sul reside cerca de 1/6 dessa diversidade (Albert e Reis, 2011; Froese e Pauly, 2016; Nelson *et al.*, 2016). No continente, a maior parte dos dactilogirídeos reconhecidos estão associados a peixes actinoptérígios das ordens Characiformes (54%), Siluriformes (24%) e Perciformes (14%), (Albert e Reis, 2011; Froese e Pauly, 2016; Nelson *et al.*, 2016), que juntos correspondem a 65% da diversidade de peixes de água doce da América do Sul (Albert e Reis, 2011).

Em estudos realizados nos últimos 10 anos, 49% das espécies de Dactylogyridae descritas no continente sul-americano foram reportadas associadas a hospedeiros siluriformes, elevando para 87 o número de espécies conhecidas infestando hospedeiros desta ordem no continente (Cohen *et al.*, 2013; Branches e Domingues, 2014; Karling *et al.*, 2014; Monteiro e Brasil-Sato, 2014; Narciso *et al.*, 2014; Neto *et al.*, 2015; Yamada *et al.*, 2015; Domingues *et al.*, 2016; Acosta, Franceschini, *et al.*, 2017; Acosta, Scholz, *et al.*, 2017; Aguiar *et al.*, 2017; Franceschini *et al.*, 2017). Mesmo com os avanços recentes sobre a diversidade de dactilogirídeos parasitas de siluriformes, nosso conhecimento acerca dessa fauna parasitária no continente é ainda incipiente. Toda informação acumulada em pouco mais de 50 anos de estudo (Figura 1B) foi gerada por meio de exames parasitológicos em hospedeiros de sete famílias, dentre as 18 com representantes na América do Sul, e sugere que menos do que 5% de sua total riqueza foi desvendada.

Entre as linhagens de dactilogirídeos encontrados em siluriformes da região Neotropical, há aquelas cujos espécimes colonizaram hospedeiros de ambientes de água doce (*i.e.* 87% das espécies), como os membros de *Amelloblastella* Kritsky, Mendoza-Franco & Scholz, 2000, *Amphocleithrum* Price & Gonzáles-Romero, 1969, *Aphanoblastella* Kritsky, Mendoza-Franco & Scholz, 2000, *Cleidodiscus* Müller, 1934, *Cosmetocleithrum* Kritsky, Thatcher & Boeger, 1986, *Demidospermus* Suriano, 1983, *Heteropriapulius* Kritsky, 2007, *Kritskyia* Kohn, 1990, *Pavanelliella* Kritsky & Boeger, 1998, *Philocorydoras* Suriano, 1986, *Trinigyrus* Hanek, Molnar & Fernando, 1974, *Urocleidoides* Mizelle & Price, 1964, *Unilatus* Mizelle & Kritsky, 1967, *Unibarra* Suriano & Incorvaia, 1995 e *Vancleaveus* Kritsky; e aqueles que são encontradas em hospedeiros de ambientes estuarinos e marinhos, como os membros de *Calceostomella* Palombi, 1943, *Chauhanellus* Bychowsky & Nagibina, 1969, *Hamatopeduncularia* Yamaguti, 1953 e *Neotetraonchus* Bravo-Hollis, 1968. Entretanto, essa organização sistemática é provisória, dada a dinâmica pela qual sinônimos e novas combinações têm sido sugeridos (Kritsky e Gutiérrez, 1998;

Kritsky *et al.*, 2000; Cohen e Kohn, 2008; Mendoza-Franco e Scholz, 2009; Monteiro *et al.*, 2010; Mendoza-Palmero e Scholz, 2011; Cohen *et al.*, 2013).

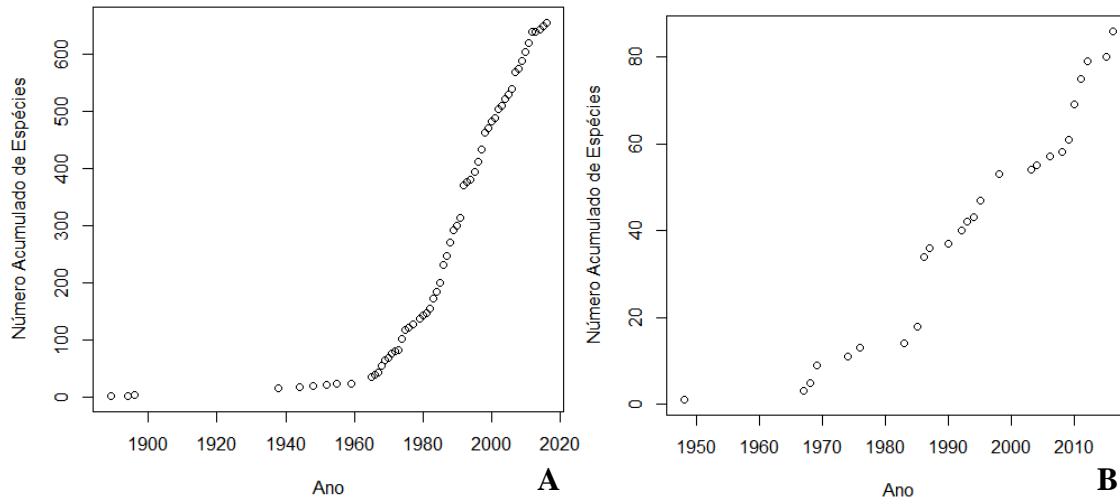


Figura 1 Número acumulado de espécies de monogenóideos parasitas de peixes (A) e de dactilogirídeos parasitas de siluriformes (B) descritos por ano na América do Sul. Análise com base nos dados de levantamento e descrições de espécies de Monogenoidea (Cohen *et al.*, 2013; Branches e Domingues, 2014; Karling *et al.*, 2014; Monteiro e Brasil-Sato, 2014; Narciso *et al.*, 2014; Neto *et al.*, 2015; Yamada *et al.*, 2015; Domingues *et al.*, 2016).

Dactylogyridae representa um agrupamento natural, embora alguns de seus componentes possam não ser monofiléticos (Kritsky e Boeger, 1989; Šimková *et al.*, 2003; Plaisance *et al.*, 2005; Šimková *et al.*, 2006; Mendlová *et al.*, 2010; Blasco-Costa *et al.*, 2012; Mendoza-Palmero *et al.*, 2015). Contudo, entre as 10 subfamílias de Dactylogyridae¹, linhagens de apenas três subfamílias tem sido testadas filogeneticamente (*i.e.*, Ancylo-discoidinae, Pseudodactylogyrinae e Dactylogyrinae) e, portanto, reconhecidas (Kritsky e Boeger, 1989; Šimková *et al.*, 2003; Plaisance *et al.*, 2005; Šimková *et al.*, 2006; Mendlová *et al.*, 2010; Blasco-Costa *et al.*, 2012; Mendoza-Palmero *et al.*, 2015). Apesar disso, ainda não há consenso sobre as relações filogenéticas sugeridas para essas subfamílias, especialmente entre pseudodactilogiríneos, dactilogiríneos e ancirocefalíneos marinhos (Figura 2).

¹Dactylogyrinae, Ancyrocephalinae, Linguadactylinae, Linguadactyloidea, Hareocephalinae, Heterotesiinae, Ancylo-discoidinae, Pseudodactylogyrinae, Anacanthorinae, reconhecidas nas análises filogenéticas de Kritsky & Boeger (1989) com base em dados morfológicos e Ancylo-discoidinae proposta por Lim *et al.* (2001) para acomodar 17 gêneros de 'anci-rocefalídeos' parasitas de siluriformes.

Diante deste quadro, o sistema parasita-hospedeiro composto por dactilogirídeos parasitas de siluriformes neotropicais é considerado um interessante modelo para estudos de reconstrução histórica na região, uma vez que ambas linhagens (*i. e.* Dactylogyridae e Siluriformes) são reconhecidamente monofiléticas, e que parte de seus componentes são endêmicos da região Neotropical. Entretanto, se faz necessário um alicerce taxonômico/sistemático para embasar estudos futuros com vistas a elucidar aspectos co-evolutivos e biogeográficos, que permitam revelar as associações históricas entre esses parasitos e seus hospedeiros.

Desta forma, o presente estudo visa contribuir para ampliar o conhecimento da diversidade e da história evolutiva de dactilogirídeos parasitas de siluriformes na América do Sul. Para atingir tais objetivos, foram realizadas análises morfológicas utilizando microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e análises moleculares pelo sequenciamento dos genes 18S, ITS1 e 28 S rDNA. Os resultados obtidos foram organizados nesta tese em três capítulos.

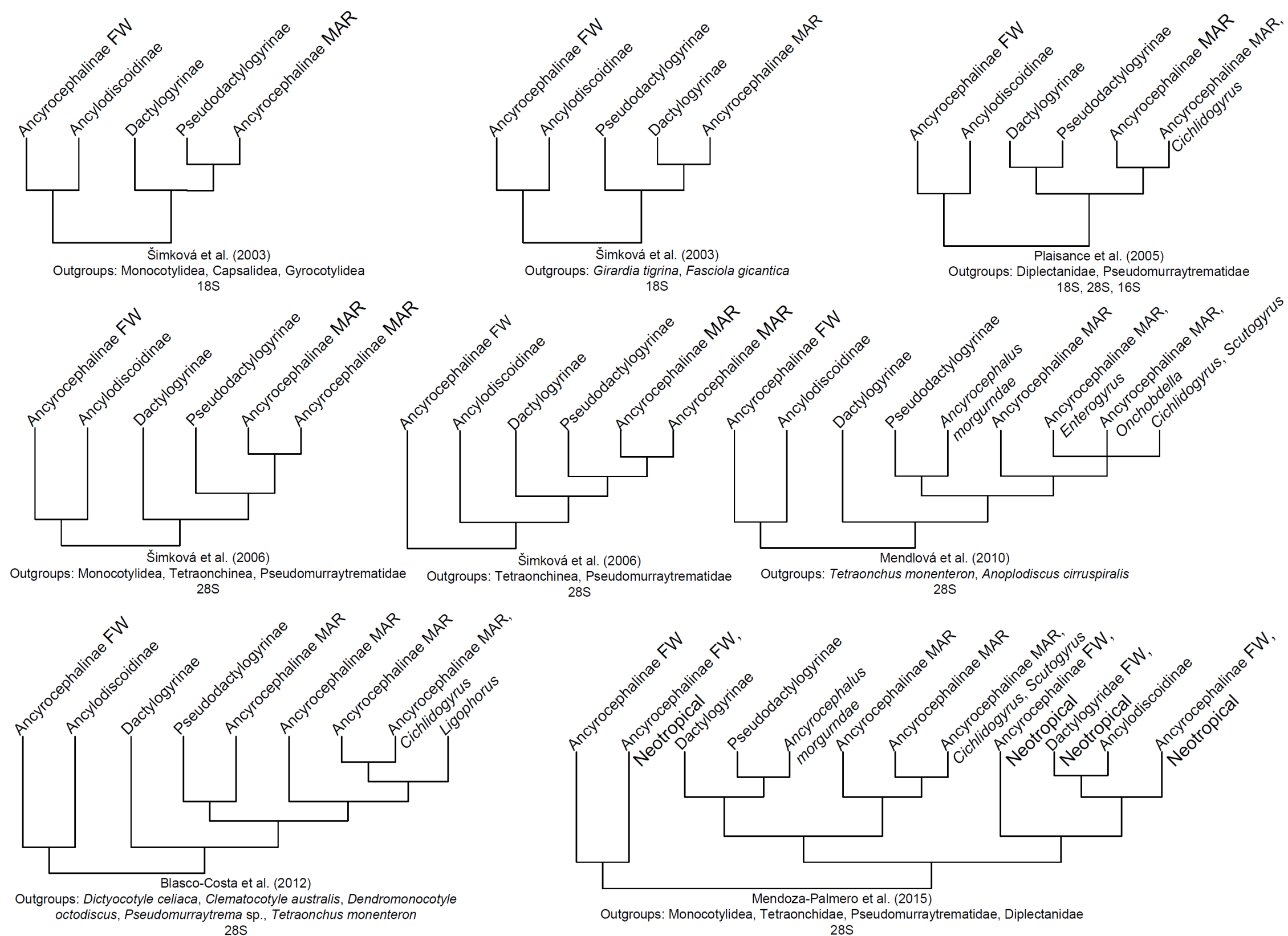


Figura 2 Propostas filogenéticas moleculares para Dactylogyridae (redesenhadas a partir das propostas originais).

1.1. Justificativa

Diante das estimativas da diversidade de Monogenoidea acima mencionadas, e da importância que o continente Sul Americano tem no contexto dessa diversidade, não é difícil deduzir que avanços no inventário da diversidade de dactilogirídeos parasitas de siluriformes na América do Sul, bem como para todo o grupo Monogenoidea, requerem esforços intensos e constantes. A catalogação da biodiversidade é um importante elemento para elaborar políticas públicas de conservação ambiental (Giangrande, 2003; Mace, 2004), sobretudo em tempos em que a biodiversidade vem sofrendo reduções drásticas diante de impactos como a perda e redução de habitats, sobreexploração de recursos naturais, poluição, doenças e mudanças climáticas de causa antrópica (Koh *et al.*, 2004; Dunn *et al.*, 2009; Barnosky *et al.*, 2011; Lafferty, 2012; Tedesco *et al.*, 2014; Iucn, 2016). No entanto, a simples compilação de dados sobre a biodiversidade não é o suficiente para compreender aspectos sobre sua origem e diversificação. É necessário inferir hipóteses utilizando métodos modernos de biologia comparativa (*i. e.* análises de endemismo, modelos lineares generalizados, geo-referenciamento, etc), que possam revelar os padrões de distribuição dessa diversidade, e para isso é imprescindível um mínimo conhecimento sobre a relação entre membros de um determinado clado (Nelson e Platnick, 1981; Poulin, 2002; Carvalho, 2009). Assim, este trabalho teve como foco propor relações evolutivas de dactilogirídeos, as quais foram obtidas a partir de estudos de sistemática filogenética destes parasitas em peixes pimelodídeos das bacias dos rios Amazonas e Paraná, Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Identificar a fauna de monogenóides parasitos de peixes da família Pimelodidae oriundos das bacias Amazônica e do Paraná, utilizando análises morfológicas (microscopia de luz e eletrônica de varredura) e análises moleculares (sequenciamento dos genes 18S rDNA, 28S rDNA e ITS1).

2.2. Propor, com base no sequenciamento dos genes 18S rDNA, 28S rDNA e ITS1, hipóteses filogenéticas para os monogenóides parasitos de peixes pimelodídeos da América do Sul.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida em parceria com o Laboratório de Genética Evolutiva da Universidade Federal de São Paulo–UNIFESP, Campus Diadema, SP, Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos–FZEA/USP, Campus Pirassununga, SP, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA/ICMBio) de Pirassununga, SP, e Laboratório de Sistemática e Coevolução (LASCO) da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Bragança, PA. A metodologia utilizada foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (CEUA nº 3179-1) e as capturas foram autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – MMA/ICMBio, através do Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO nº 42427-3) (ANEXOS I e II).

3.1. Locais de coleta e de depósito dos hospedeiros

Para o desenvolvimento dessa proposta foram realizadas três coletas na bacia Amazônica (sub-bacia dos rios Amazonas, Tapajós, Juruena), especificamente no Rio Tapajós nos municípios de Itaituba e Santarém, no Estado do Pará. Em Itaituba as coletas foram feitas em setembro-outubro de 2011 e em junho de 2012 e em Santarém em outubro de 2014 (Figura 3). Durante essas coletas foram examinados peixes de 10 espécies de Pimelodidae (Tabela 1). Adicionalmente foram feitas três coletas no Estado de São Paulo, duas no rio Mogi Guaçu (bacia do Rio Paraná, sub-bacia do Rio Grande), em abril de 2012 e em janeiro de 2016 e outra na represa do CEPTA/ICMBio, em setembro de 2016, todas no distrito de Cachoeira de Emas, município de Pirassununga. Essas coletas da bacia do rio Paraná tiveram como objetivo coletar espécimes de *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803, *Pimelodus microstoma* Steindachner, 1877 (Pimelodidae) e *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Erithrinidae). Esses pimelodídeos são conhecidos por albergarem dactilogirídeos dos gêneros *Pavanelliella* e *Demidospermus*, e o eritrinídeo, *Urocleidoides*. No decorrer do trabalho, observou-se que a inserção desses parasitas nas análises filogenéticas seria fundamental para entendermos as relações entre as espécies de *Pavanelliella* e de duas espécies *incertae sedis* de *Urocleidoides*.

A validação específica dos hospedeiros (Figuras 4, 5, Tabela 1) coletados para estudo de Monogenoidea foi feita de acordo com Britski *et al.* (1999), Buckup *et al.* (2007), Lundberg e Littmann (2003) e Queiroz *et al.* (2013). Espécimes e amostras de tecidos dos hospedeiros foram e estão sendo depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Universidade Estadual de São Paulo “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Botucatu (LBP/UNESP).

3.2. Coleta, processamento e análise dos parasitas

As narinas de todos os peixes pimelodídeos foram abertas com tesouras de dissecação e lavadas com jatos de água quente (~65°C), injetado por uma seringa, diretamente dentro de cada narina. O material expelido a partir da injeção de água foi coletado em placas de Petri e examinado sob microscópio estereoscópico em busca dos parasitas. Quando presentes, estes parasitas foram então coletados e fixados em formalina 4% (destinados ao estudo morfológico) e em etanol 100% (para as análises moleculares). As brânquias foram removidas com instrumentos cirúrgicos e foram fixadas em formalina 4% a ~65°C ou em etanol 100%. A triagem das brânquias foi realizada em laboratório e os parasitas recuperados foram mantidos em tubos contendo o mesmo fixador visando os estudos morfológicos (aqueles fixados em formolina 4%) e moleculares (aqueles fixados em etanol 100%).

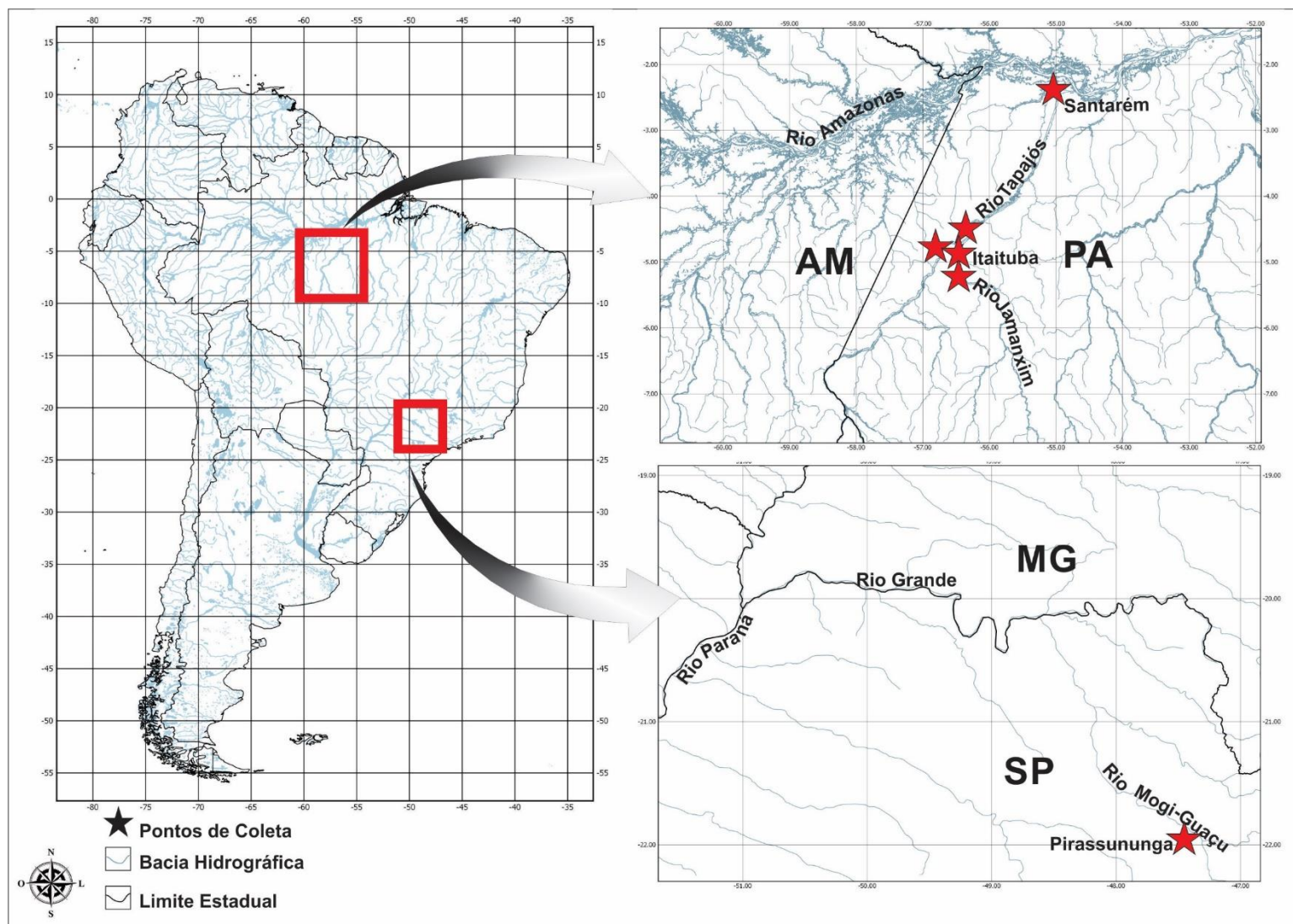


Figura 3 Pontos de coleta na bacia do rio Tapajós, Estado do Pará, e na bacia do rio Paraná, Estado de São Paulo, Brasil.

Tabela 1 Espécies de peixes, com comprimento e peso médio \pm desvio padrão (DP), localidade de coleta e número de peixes examinados (N), durante este estudo para diagnose de monogenóideos.

Espécie de Peixe	N	Localidade	Comprimento (cm) \pm DP e peso (g) \pm DP
<i>Leiarius marmoratus</i> (Gill, 1870)	3	Rio Tapajós, Itaituba (04° 33' 10" N, 56° 17' 60" W)	41 \pm 20; 949 \pm 827
<i>Pimelodus blochii</i> Valenciennes, 1840	2	Igarapé Bazim*, Itaituba (04° 47' 24.1" N, 56° 46' 40" W)	17 \pm 2; 53.5 \pm 17
	1	Igarapé Tracuá*, Itaituba (04° 29' 1" N, 56° 17' 2" W)	
<i>Pimelodus ornatus</i> Kner, 1858	6	Lago do Varela**, Itaituba (04° 44' 40" N, 56° 25' 42" W)	14 \pm 3; 50 \pm 20
<i>Pinirampus pirinampu</i> (Spix & Agassiz, 1829)	4	Rio Tapajós, Itaituba (04° 33' 10" N, 56° 17' 60" W)	58 \pm 12; 1833 \pm 1232
<i>Platynemichthys notatus</i> (Jardine, 1841)	4	Rio Tapajós r, Itaituba (04° 33' 10" N, 56° 17' 60" W)	60 \pm 13; 2469 \pm 1380
<i>Phractocephalus hemiliopterus</i> (Bloch & Schneider, 1801) #	4	Rio Tapajós, Itaituba (04° 33' 10" N, 56° 17' 60" W)	56 \pm 19; 2705 \pm 3295
	7	Rio Tapajós, Santarém (02° 20' 13" N, 54° 52' 53" W)	
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> (Castelnau, 1855)	9 ⁺	Igarapé Jari*, Santarém (2° 20' 24" N, 54° 53' 59" W)	46 \pm 16; 1154 \pm 1177
	2	Rio Tapajós, Itaituba (04° 33' 10" N, 56° 17' 60" W)	
<i>Pseudoplatystoma punctifer</i> (Castelnau, 1855)	2 ⁺	Igarapé Jari*, Santarém (2° 20' 24" N, 54° 53' 59" W)	62 \pm 18; 2371 \pm 2611
	2 ⁺	Lagoa no Rio Jamanxim*, Itaituba (04° 45' 19.2" N, 56° 26' 16.4" W)	
	3 ⁺	Rio Tapajós, Santarém (2° 20' 13" N, 54° 52' 53" W)	
	5 ⁺	Rio Tapajós, Itaituba (04° 33' 10" N, 56° 17' 60" W)	
	2 ⁺	Igarapé Jari*, Santarém (2° 20' 24" N, 54° 53' 59" W)	
<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i> (Valenciennes, 1840)	3 ⁺	Igarapé Tracuá*, Itaituba (04° 29' 1" N, 56° 17' 2" W)	58 \pm 12; 1745 \pm 1056
	1 ⁺	Lagoa no Rio Jamanxim *, Itaituba (04° 45' 19.2" N, 56° 26' 16.4" W)	
	3 ⁺	Rio Tapajós, Santarém (2° 20' 13" N, 54° 52' 53" W)	
	1 ⁺	Rio Tapajós, Itaituba (04° 33' 10" N, 56° 17' 60" W)	
	3 ⁺	Rio Jamanxim*, Itaituba (05° 14' 07" N, 56° 25' 49" W)	
<i>Zungaro zungaro</i> (Humboldt, 1821)	1	Rio Tapajós, Itaituba (04° 33' 10" N, 56° 17' 60" W)	97 \pm 32; 14.419 \pm 9749
<i>Pimelodus maculatus</i> (Lacepède, 1803)	1 ⁺	Rio Mogi-Guacu ***, Pirassununga (21° 55' 33" S, 47° 22' 7" W)	26; 215
<i>Pimelodus microstoma</i> Steindachner, 1877	1 ⁺	Mogi-Guacu River***, Pirassununga (21° 55' 33" S, 47° 22' 7" W)	13; 61g
<i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794)	1 ⁺⁺	CEPTA/ICMBio, Pirassununga (21° 55' 54" S, 47° 22' 37" O)	23; 150

Tributário do Rio Tapajós*; Lagoa ligada ao Rio Tapajós**; Bacia do Rio Paraná***; ⁺há espécimes parasitados por *Pavanelliella* spp. e ⁺⁺por *U. malabaricus*.

A narina de todos pimelodídeos foi examinada, porém apenas as brânquias de *P. hemiliopterus* foi completamente examinada.



Figura 4 Peixes do rio Tapajós examinados no presente estudo. **A** *Phractocephalus hemioliopus* **B** *Brachyplatystoma rousseauxii* **C** *Pseudoplatystoma punctifer* **D** *Zungaro zungaro* **E** *Pseudoplatystoma tigrinum*. Barra de escala 25cm



Figura 5 Peixes adicionais examinados no presente estudo para coleta de *Pavanelliella*, *Demidospermus* e *Urocleidoides*. **A** *Pimelodus maculatus* (Fonte: Aguiar [2011]) **B** *Pimelodus microstoma* (Fonte: Aguiar [2011]) **C** *Hoplias malabaricus* (Fonte: Leonardo Milano). Barra de escala 10cm.

3.3. Análises morfológicas

Os helmintos foram corados pelo método de tricrômico de Gomori, clarificados em creosoto de Faia e montados entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá ou Goma de Damar. Essa preparação é importante para estudo de tecidos e estruturas moles. As partes esclerotizadas dos parasitas (*i.e.* OCM, vagina, barras, âncoras e ganchos) foram analisadas principalmente com os espécimes preparados em meio de Grey & Wess (Kritsky *et al.*, 1986). Alguns ainda foram corados e montados em Grey & Wess (Boeger & Vianna, 2006; Aguiar *et al.*, 2011). Foi usado um microscópio óptico Leica DM2500 equipado com contraste de fase, contraste de interferência diferencial (DIC) e com um tubo de desenho acoplado para a produção das ilustrações. As medidas, expressas em micrômetros (μm), são todas baseadas no uso de imagens digitais processadas no software ImageJ 1.43m (Rasband, 2015) e foram tomadas a partir de uma linha reta imaginária, traçada entre dois pontos mais distantes das estruturas (Mizelle e Klucka, 1953; Aguiar *et al.*, 2011), exceto a do órgão copulador masculino (OCM), o qual foi mensurado completamente (Figura 6). A média das medidas é apresentada para cada estrutura de cada espécie, seguida pela amplitude das medidas e o número de espécimes mensurados (n), entre parênteses.

As análises em microscopia eletrônica de varredura foram feitas com espécimes fixados em formol 4%. Esses espécimes foram transferidos para etanol 70% e gradualmente hidratados em água destilada. Foram feitas algumas lavagens com água destilada além de uma limpeza dos helmintos com pincéis. Transferimos os helmintos da água destilada para Tetróxido de Ósmio 1%, deixando-os imersos por 2 horas. Depois desidratamos os helmintos progressivamente até etanol 100%. Posteriormente, os helmintos foram levados ao ponto crítico e então metalizados com pulverização de ouro. Por fim, examinamos com microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM 35 operado a 10 kV) do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp.

Os dactilogirídeos foram identificados de acordo com a chave de Boeger e Vianna (2006) e com as descrições originais de gêneros e espécies. Os descritores quantitativos das infrapopulações parasitárias foram os sugeridos por Bush *et al.* (1997). Espécimes representativos ou que representem séries típicas estão sendo depositados na Coleção de Invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA-PLH), Coleção de Platyhelminthes do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC-PLA) e na Coleção Helminológica do

Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC). Foi consultado² material tipo referente a dactilogirídeos parasitas de siluriformes depositado em instituições nacionais e (INPA e CHIOC) e na US National Parasite Collection do National Museum of Natural History, Smithsonian Institution (USNM), em Wasington DC, EUA.

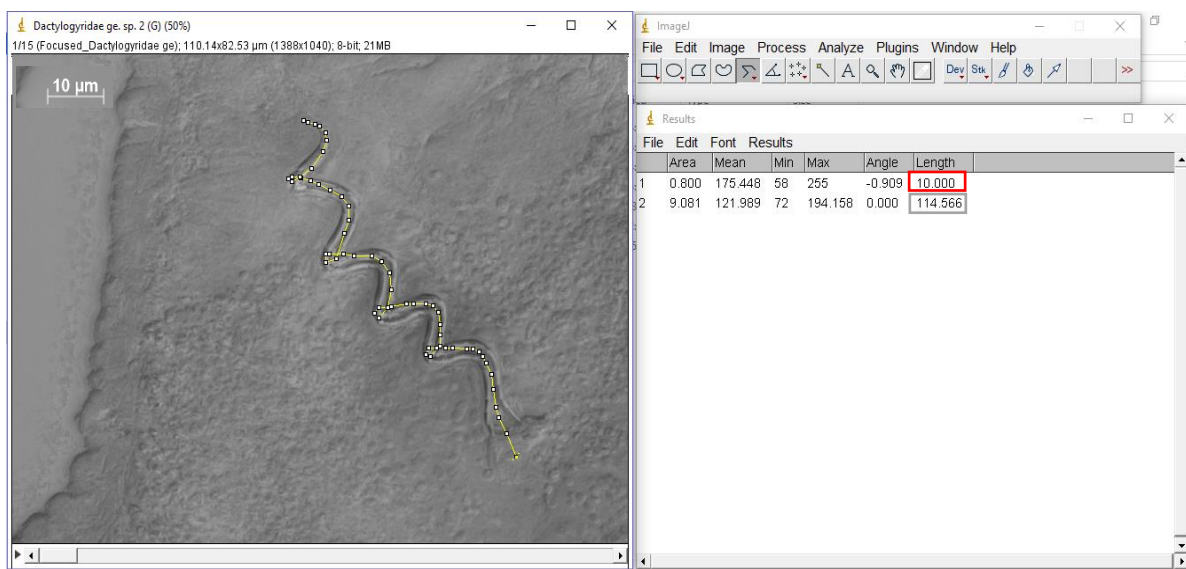


Figura 6 Mensuração do órgão copulador masculino (OCM). Após a calibração da escala de medida em micrômetros (quadrado vermelho), a mensuração é realizada por meio da ferramenta “segmented line” (linha amarela pontilhada no OCM), a qual, após o comando “measure” emite o valor do comprimento do OCM (quadrado vermelho).

3.4. Análises moleculares

3.4.1. Extração de DNA

Um único espécime de cada espécie de Dactylogyridae foi colocado em uma lâmina com uma solução de proteinase K (20 mg/mL) diluída a 1:40 num tampão de lise (pH 8, Tris-Cl 10 mM, EDTA 25 mM, NaCl 100 mM E 0,5% de SDS) a 56 ° C. As estruturas de diagnose do helminto foram observadas e fotografadas durante cinco a dez minutos com uma microscópio optico Leica DM1000. A reação de digestão foi interrompida por diluição da proteinase K com o tampão de lise.

²Vide lista de espécimes consultados no ANEXO III.

O helminto foi então transferido para um tubo de 1,5 mL com 5 µL de tampão de lise e então foi desidratado em um concentrador Eppendorf Vacufuge 5301 (Hamburgo, Alemanha). A extração de DNA foi realizada utilizando-se um kit DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA), seguindo as instruções do fabricante. A concentração do DNA foi verificada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA).

3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As PCR's foram realizadas em um termociclador ProFlex™ PCR System Thermal Cycler (Thermo Scientific Wilmington, USA). As reações foram feitas com um volume final de 25 µl utilizando o DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific Wilmington, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os primers utilizados³, bem como as condições específicas de cada PCR foram detalhadas na metodologia de cada capítulo da tese.

Os *amplicons* provenientes de cada PCR, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (BioAmerica, Miami, FL, EUA) em tampão TBE (Tris-borato 0,045 M, EDTA 0,001 M, pH 8,0), corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific Wilmington, USA). Cada gel foi analisado em um transiluminador K33-3333 (Kasvi, Paraná, Brasil), quando o tamanho e a qualidade dos *amplicons* foram comparados com os padrões 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen by Life Technologies, CA, USA) e Low DNA Mass Ladder (Invitrogen by Life Technologies, CA, USA). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA) e o sequenciamento foi realizado no Centro de Estudo do Genoma Humano (CEGH), da Universidade de São Paulo (USP), com um kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc., CA, USA) em um sequenciador ABI 3730 DNA sequencing analyzer (Applied Biosystems).

3.5. Inferências filogenéticas

Todos os *contigs* obtidos dos sequenciamentos foram editados usando o programa BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999) e um alinhamento básico (BLAST) foi conduzido (Altschul *et al.*, 1997) para

³Anexo IV mostra o local de anelamento de cada *primer* nos genes alvos do presente estudo.

verificar a similaridade das sequências obtidas no presente estudo com outras sequências de monogenóides depositadas no NCBI BioSystems database (Geer *et al.*, 2009). Os alinhamentos das sequências foram feitos com o algoritmo do ClustalW Version 2 (Larkin *et al.*, 2007) implementado no SeaView Version 4 (Gouy *et al.*, 2010). A fim de estimar a divergência evolutiva entre as sequências obtidas no presente estudo, foram realizadas comparações, para cada par de sequências, do número de nucleotídeos diferentes e, das taxas de substituições de nucleotídeos entre o par de sequências. Essas análises foram realizadas usando o algoritmo *Maximum Composite Likelihood* implementado no programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), tratando *gaps* como deleção completa.

Foram produzidos blocos de genes, selecionando as opções menos rigorosas, para os alinhamentos realizados (Talavera e Castresana, 2007). As árvores filogenéticas foram geradas a partir dos blocos de genes alinhados usando os métodos filogenéticos de Inferência Bayesiana (Bayesian Inference – BI) e Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood – ML). As análises com base em BI foram realizadas usando o programa MrBayes version 3.2 software package (Ronquist *et al.*, 2012) com uma configuração da análise de acordo com os comandos *lset nst=mixed*, que permite que o programa busque o melhor modelo evolutivo para o conjunto de dados e, *rates=invgamma*, o qual permite ao programa considerar duas possibilidades, as quais consideram ora que não há variação nos caracteres e ora que ocorre variação do tipo gamma, sendo por isso a mais recomendada (Ronquist *et al.*, 2012). Contudo, aplicando uma especificidade para cada conjunto de dados, referente ao número de análises e amostragens de topologias, exibidos em cada capítulo dessa tese. As análises com base em ML foram feitas com o programa PhyML with Smart Model Selection (Guindon *et al.*, 2010; Lefort *et al.*, 2016), com suporte validado por meio de 1000 réplicas de *bootstrap*. Os dados referentes aos grupos externos utilizados nas análises também estão disponíveis em cada capítulo da tese. Os suportes dos ramos foram categorizados como fraco, moderado, bom ou forte como proposto por Yang *et al.* (2006). As regiões zoogeográficas consideradas nas árvores filogenéticas são aquelas identificadas por Holt *et al.* (2013).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A. A.; FRANCESCHINI, L.; ZAGO, A. C.; SCHOLZ, T.; DA SILVA, R. J. Six new species of *Heteropriapulus* (Monogenea: Dactylogyridae) from South American fishes with an amended diagnosis to the genus. **Zootaxa**, v. 4290, n. 3, p. 459–482, 2017. ISSN 1175-5326.

ACOSTA, A. A.; SCHOLZ, T.; BLASCO-COSTA, I.; ALVES, P. V.; DA SILVA, R. J. A new genus and two new species of dactylogyrid monogeneans from gills of Neotropical catfishes (Siluriformes: Doradidae and Loricaridae). **Parasitology International**, 2017. ISSN 1383-5769.

AGUIAR, J. C.; CECCARELLI, P. S.; LUQUE, J. L. Two new species of *Pavanelliella* (Monogenea, Dactylogyridae) parasitic on pimelodid fishes from Mogi Guaçu river, Southeastern Brazil, and notes on the morphology of *P. pavanellii*. **Neotropical Helminthology**, v. 5, n. 2, p. 213–224, 2011. ISSN 1995-1043.

AGUIAR, J. C.; MAIA, A. A.; SILVA, M. R.; CECCARELLI, P. S.; DOMINGUES, M. V.; ADRIANO, E. A. An integrative taxonomic study of *Pavanelliella* spp. (Monogenoidea, Dactylogyridae) with the description of a new species from the nasal cavities of an Amazon pimelodid catfish. **Parasitology International**, v. 66, n. 6, p. 777–788, 2017. ISSN 1383-5769.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**. London, England: University of California Press, 2011. ISBN 0520268687.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997. ISSN 0305-1048.

BARNOSKY, A. D.; MATZKE, N.; TOMIYA, S.; WOGAN, G. O.; SWARTZ, B.; QUENTAL, T. B.; MARSHALL, C.; MCGUIRE, J. L.; LINDSEY, E. L.; MAGUIRE, K. C. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? **Nature**, v. 471, n. 7336, p. 51–57, 2011. ISSN 0028-0836.

BLASCO-COSTA, I.; MIGUEZ-LOZANO, R.; SARABEEV, V.; BALBUENA, J. A. Molecular phylogeny of species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) and their affinities within the

Dactylogyridae. **Parasitology International**, v. 61, n. 4, p. 619–27, Dec 2012. ISSN 1873-0329 (Electronic) 1383-5769 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22742900> >.

BOEGER, W. A.; KRITSKY, D. C. Phylogenetic relationships of the Monogenoidea. **Systematics Association Special Volume**, v. 60, p. 92–102, 2001. ISSN 0309-2593.

BOEGER, W. A.; VIANNA, R. T. Monogenoidea. In: THATCHER, V. E. (Ed.). **Amazon fish parasites**. Sofia: Pensoft Publishers, 2006. p.42–116.

BRANCHES, B.; DOMINGUES, M. A new species of *Unilatus* (Platyhelminthes: Monogenoidea) from the gills of *Leporacanthicus galaxias* Isbrücker et Nijssen (Siluriformes: Loricariidae) from Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 59, n. 1, p. 91–97, 2014. ISSN 1896-1851.

BRITSKI, H. A.; DE SILIMON, K. Z. D. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. Embrapa-SPI Brasília, 1999. ISBN 8573830530.

BROOKS, D. R.; MCLENNAN, D. A. Comparative study of adaptive radiations with an example using parasitic flatworms (Platyhelminthes: Cercomeria). **American Naturalist**, p. 755-778, 1993. ISSN 0003-0147.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. A. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional Rio de Janeiro, 2007.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 575–583, 1997. ISSN 0022-3395.

BYCHOWSKY, B. E. Monogenetic trematodes: their systematics and phylogeny. **American Institute of Biological Sciences**, 1961.

CARVALHO, C. J. B. D. Padrões de endemismos e a conservação da biodiversidade. **Megadiversidade**, v. 5, n. 1–2, p. 77–86, 2009.

COHEN, S. C.; JUSTO, M. C. N.; KOHN, A. **South American Monogenoidea Parasites of Fishes, Amphibians and Reptiles**. Rio de Janeiro: Oficina de Livros, 2013. 663 ISBN 9788590702719. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=OU3unQEACAAJ> >.

COHEN, S. C.; KOHN, A. New data on species of *Demidospermus* (Dactylogyridae, Monogenea) parasitizing fishes from the reservoir of the Itaipu hydroelectric power station, Parana state, Brazil, with new synonymies. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 167–170, 2008.

DOMINGUES, M. V.; SOARES, G. B.; WATANABE, A. Monogenoidea (Polyonchoinea: Dactylogyridae) parasitizing the gills of marine catfish (Siluriformes: Ariidae) inhabiting the Atlantic Amazon Coast of Brazil. **Zootaxa**, v. 4127, n. 2, p. 301, 2016. ISSN 1175-5334.

DUNN, R. R.; HARRIS, N. C.; COLWELL, R. K.; KOH, L. P.; SODHI, N. S. The sixth mass coextinction: are most endangered species parasites and mutualists? **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1670, p. 3037–3045, 2009. ISSN 0962-8452.

FRANCESCHINI, L.; ZAGO, A.; MÜLLER, M.; FRANCISCO, C.; TAKEMOTO, R.; DA SILVA, R. Morphology and molecular characterization of *Demidospermus spirophallus* n. sp., *D. prolixus* n. sp. (Monogenea: Dactylogyridae) and a redescription of *D. anus* in siluriform catfish from Brazil. **Journal of Helminthology**, p. 1–16, 2017. ISSN 0022-149X.

FROESE, R.; PAULY, D. FishBase. World Wide Web electronic publication. 2016. Disponível em: < www.fishbase.org/search.php >. Acesso em: 10/2016.

GEER, L. Y.; MARCHLER-BAUER, A.; GEER, R. C.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; LIU, C.; SHI, W.; BRYANT, S. H. The NCBI biosystems database. **Nucleic Acids Research**, p. gkp858, 2009. ISSN 0305-1048.

GIANGRANDE, A. Biodiversity, conservation, and the ‘Taxonomic impediment’. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 13, n. 5, p. 451–459, 2003. ISSN 1099-0755.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221–224, 2010. ISSN 0737-4038.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.-F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010. ISSN 1063-5157.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** v. 41, p. 95–98, 1999.

HÉRITIER, L.; BADETS, M.; DU PREEZ, L. H.; AISIEN, M. S.; LIXIAN, F.; COMBES, C.; VERNEAU, O. Evolutionary processes involved in the diversification of chelonian and mammal polystomatid parasites (Platyhelminthes, Monogenea, Polystomatidae) revealed by palaeoecology of their hosts. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 92, p. 1–10, 2015. ISSN 1055-7903.

HOLT, B. G.; LESSARD, J.-P.; BORREGAARD, M. K.; FRITZ, S. A.; ARAÚJO, M. B.; DIMITROV, D.; FABRE, P.-H.; GRAHAM, C. H.; GRAVES, G. R.; JØNSSON, K. A. An update of Wallace’s zoogeographic regions of the world. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 74–78, 2013. ISSN 0036-8075.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3. **Why is biodiversity in crisis?**, 2016. Disponível em: < www.iucnredlist.org >. Acesso em: January 2017.

KARLING, L. C.; LOPES, L. P. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. New species of *Tereancistrum* (Dactylogyridae) monogenean parasites of *Schizodon borellii* (Characiformes, Anostomidae) from Brazil, and emended diagnosis for *T. parvus*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 365–369, 2014. ISSN 1807-863X.

KOH, L. P.; DUNN, R. R.; SODHI, N. S.; COLWELL, R. K.; PROCTOR, H. C.; SMITH, V. S. Species coextinctions and the biodiversity crisis. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1632–1634, 2004. ISSN 0036-8075.

KRITSKY, D. C.; BOEGER, W. A. The phylogenetic status of the Ancyrocephalidae Bychowsky, 1937 (Monogenea, Dactylogyroidea). **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 207–211, 1989.

KRITSKY, D. C.; GUTIÉRREZ, P. A. Neotropical Monogenoidea. 34. Species of *Demidospermus* (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae) from the gills of pimelodids (Teleostei, Siluriformes) in Argentina. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v. 65, p. 147–159, 1998.

KRITSKY, D. C.; MENDOZA-FRANCO, E.; SCHOLZ, T. Neotropical Monogenoidea. 36. Dactylogyrids from the gills of *Rhamdia guatemalensis* (Siluriformes: Pimelodidae) from cenotes of the Yucatan Peninsula, Mexico, with proposal of *Ameloblastella* gen. n. and *Aphanoblastella* gen. n. (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae). **Comparative Parasitology**, v. 67, n. 1, p. 76–84, 2000.

LAFFERTY, K. D. Biodiversity loss decreases parasite diversity: theory and patterns. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1604, p. 2814–2827, 2012. ISSN 0962-8436.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007. ISSN 1367-4803.

LEFORT, V.; LONGUEVILLE, J.-E.; GASCUEL, O. PhyML with Smart Model Selection. France, 2016. Disponível em: < <http://www.atgc-montpellier.fr/> >. Acesso em: October.

LITTLEWOOD, D. The evolution of parasitism in flatworms. In: MAULE, A. G. e MARKS, N. J. (Ed.). **Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology**. London, UK: CAB International, 2006. p.1–36.

LITTLEWOOD, D. T. J.; OLSON, P. D. Small subunit rDNA and the platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. In: LITTLEWOOD, D. T. J. e BRAY, R. A. (Ed.). **Interrelationships of the Platyhelminthes**. London: Taylor & Francis 2001. p.380.

LUNDBERG, J. G.; LITTMANN, M. W. Family Pimelodidae (Long-wiskered catfish). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O., *et al* (Ed.). **In Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America** Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p.IV+729.

MACE, G. M. The role of taxonomy in species conservation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1444, p. 711–719, 2004. ISSN 0962-8436.

MENDLOVÁ, M.; PARISELLE, A.; VYSKOČILOVÁ, M.; ŠIMKOVÁ, A. Molecular phylogeny of monogeneans parasitizing African freshwater Cichlidae inferred from LSU rDNA sequences. **Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1405–13, Nov 2010. ISSN 1432-1955 (Electronic) 0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697913> >.

MENDOZA-FRANCO, E. F.; SCHOLZ, T. New dactylogyrids (Monogenea) parasitizing the gills of catfishes (Siluriformes) from the Amazon River basin in Peru. **Journal of Parasitology** v. 95, n. 4, p. 865–870, Aug 2009. ISSN 1937-2345 (Electronic) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19215149> >.

MENDOZA-PALMERO, C. A.; BLASCO-COSTA, I.; SCHOLZ, T. Molecular phylogeny of Neotropical monogeneans (Platyhelminthes: Monogenea) from catfishes (Siluriformes). **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 164, p. 1–11, 2015. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25890068> >.

MENDOZA-PALMERO, C. A.; SCHOLZ, T. New species of *Demidospermus* (Monogenea: Dactylogyridae) of pimelodid catfish (Siluriformes) from Peruvian Amazonia and the reassignment of *Urocleidoides lebedevi* Kritsky and Thatcher, 1976. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 586–592, Aug 2011. ISSN 1937-2345 (Electronic) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21506840> >.

MIZELLE, J. D.; KLUCKA, A. R. Studies on monogenetic trematodes. XIV. Dactylogyridae from Wisconsin fishes. **American Midland Naturalist**, v. 49, n. 3, p. 720–733, 1953. ISSN 0003-0031.

MONTEIRO, C. M.; BRASIL-SATO, M. C. A new species of *Anacanthoroides* and redescription of *Apedunculata discoidea* (Monogenoidea) parasitizing *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii) from the São Francisco River, Brazil. **Zootaxa**, v. 3784, n. 3, p. 259–266, 2014. ISSN 1175-5334.

MONTEIRO, C. M.; KRITSKY, D. C.; BRASIL-SATO, M. C. Neotropical monogenoidea. 55. Dactylogyrids parasitising the pintado-amarelo *Pimelodus maculatus* Lacepede (Actinopterygii: Pimelodidae) from the Rio São Francisco, Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 179–190, Jul 2010. ISSN 1573-5192 (Electronic) 0165-5752 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532849> >.

NARCISO, R. B.; BRANDÃO, H.; YAMADA, F. H.; BENINE, R. C.; DA SILVA, R. J. A new species of *Trinibaculum* (Monogenea: Dactylogyridae) parasite of the gills of *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819)(Characiformes: Characidae) in a neotropical river, São Paulo state, Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 8, n. 1, p. 85–95, 2014. ISSN 1995-1043.

NELSON, G.; PLATNICK, N. I. Systematics and Biogeography: Cladistics and Vicariance. **Columbia University Press**, 1981. ISBN 0-231-04574-3.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016. ISBN 1119220823.

NETO, J. F. S.; RODRIGUES, A. R.; DOMINGUES, M. V. Proposal of *Whittingtonocotyle* n. gen.(Dactylogyroidea: Dactylogyridae), with the description of two new species from the gills of *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes: Erythrinidae) in Brazil. **Zootaxa**, v. 3937, n. 1, p. 191–200, 2015. ISSN 1175-5334.

PLAISANCE, L.; LITTLEWOOD, D. T. J.; OLSON, P. D.; MORAND, S. Molecular phylogeny of gill monogeneans (Platyhelminthes, Monogenea, Dactylogyridae) and colonization of Indo-West Pacific butterflyfish hosts (Perciformes, Chaetodontidae). **Zoologica Scripta**, v. 34, n. 4, p. 425–436, 2005. ISSN 0300-3256/1463-6409.

POULIN, R. The evolution of monogenean diversity. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 3, p. 245–254, 2002. ISSN 0020-7519.

POULIN, R.; MORAND, S. **Parasite biodiversity**. Washington, USA: Smithsonian Institution, 2004. ISBN 1935623494.

QUEIROZ, L.; TORRENTE-VILARA, G.; OHARA, W.; PIRES, T.; ZUANON, J.; DORIA, C. Peixes do Rio Madeira. **Editora Dialeto, São Paulo**, p. 1163, 2013.

RASBAND, W. S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland, USA, 2015. Disponível em: < <http://imagej.nih.gov/ij/> >. Acesso em: 10/2016.

ROBERTS, L. S.; JANOVY JR, J. **Foundations of Parasitology**. 8th. New York: McGraw-Hill Companies, Inc., 2009. 719 ISBN ISBN 978-0-07-302827-9.

ROHDE, K. Robust phylogenies and adaptive radiations: a critical examination of methods used to identify key innovations. **American Naturalist**, p. 481–500, 1996. ISSN 0003-0147.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012. ISSN 1063-5157.

ŠIMKOVÁ, A.; MATEJUSOVA, I.; CUNNINGHAM, C. O. A molecular phylogeny of the Dactylogyridae sensu Kritsky & Boeger (1989) (Monogenea) based on the D1-D3 domains of large subunit rDNA. **Parasitology**, v. 133, n. Pt 1, p. 43–53, Jul 2006. ISSN 0031-1820 (Print) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16515727> >.

ŠIMKOVÁ, A.; PLAISANCE, L.; MATĚJUSOVÁ, I.; MORAND, S.; VERNEAU, O. Phylogenetic relationships of the Dactylogyridae Bychowsky, 1933 (Monogenea: Dactylogyridea): the need for the systematic revision of the Ancyrocephalinae Bychowsky, 1937. **Systematic Parasitology**, v. 54, p. 1–11, 2003.

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, v. 56, p. 564–577, 2007. ISSN 1063-5157.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, p. mst197, 2013. ISSN 0737-4038.

TEDESCO, P.; BIGORNE, R.; BOGAN, A.; GIAM, X.; JÉZÉQUEL, C.; HUGUENY, B. Estimating how many undescribed species have gone extinct. **Conservation Biology**, v. 28, n. 5, p. 1360–1370, 2014. ISSN 1523-1739.

WHITTINGTON, I. D. Diversity “down under”: monogeneans in the Antipodes (Australia) with a prediction of monogenean biodiversity worldwide. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 1481–1493, 1998. ISSN 0020-7519.

YAMADA, F.; BRANDÃO, H.; YAMADA, P.; DA SILVA, R. *Philocorydoras longus* sp. n. (Monogenea, Dactylogyridae) from the gills of *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae) in Southeastern Brazil and the reassignment of two species from the genus *Urocleidoides* to *Philocorydoras*. **Helminthologia**, v. 52, n. 4, p. 331–335, 2015. ISSN 1336-9083.

YANG, J.; HE, S.; FREYHOF, J.; WITTE, K.; LIU, H. The phylogenetic relationships of the Gobioninae (Teleostei: Cyprinidae) inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. **Hydrobiologia**, v. 553, n. 1, p. 255–266, 2006. ISSN 0018-8158.

5. RESULTADOS

Os resultados desta tese foram divididos em três capítulos, nos quais são descritas novas espécies de dactilogirídeos parasitas de pimelodídeos coletados do rio Tapajós (sub-bacia dos rios Juruena, Tapajós, Amazonas) e são propostas hipóteses de relação filogenética para esses dactilogirídeos com base em dados moleculares. No capítulo um, descreve-se uma nova espécie de *Pavanelliella* e utilizando os marcadores 18S rDNA parcial + ITS1, compara-se a nova espécie a outras espécies do gênero previamente descritas, além de propor uma hipótese filogenética envolvendo outras espécies de dactilogirídeos globalmente distribuídos. O capítulo dois traz a descrição de uma nova espécie de *Ameloblastella*, bem como propõe uma hipótese de relacionamento filogenético com outros dactilogirídeos utilizando as regiões D1 – D3 do marcador 28S rDNA. No capítulo três foram abordadas a descrição de uma nova espécie de *Demidospermus* e a redescritção de duas outras do gênero, para as quais são propostas novas combinações. Foi ainda proposto um novo gênero para Gen. n. sp. n., sendo todas propostas fundamentadas por hipótese filogenética com base no marcador 18S rDNA total.

6. CAPÍTULO 1. AN INTEGRATIVE TAXONOMIC STUDY OF *PAVANELLIELLA* SPP. (MONOGENOIDEA, DACTYLOGYRIDAE) WITH THE DESCRIPTION OF A NEW SPECIES FROM THE NASAL CAVITIES OF AN AMAZON PIMELODID CATFISH

(Publicado na Parasitology International – segue a formatação do periódico)

ABSTRACT

The present study is an integrative taxonomic analysis of *Pavanelliella* spp. (Monogenoidea, Dactylogyridae), and describes a new species from the nasal cavities of the Amazonian pimelodid catfish *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes Pimelodidae) from the Tapajós River (Amazon Basin, Pará state, Brazil). *Pavanelliella* sp. n. is characterized by the presence of 3–4 rings in the male copulatory organ, the absence of rings around the vaginal atrium and by its sinuous vaginal canal, which sometimes forms 0.5–1 rings in the distal portion. The sequencing of the small subunit ribosomal DNA (ssrDNA) and internal transcribed spacer 1 (ITS-1) of three species of *Pavanelliella*, *Vancleaveus cicinnus*, and an undetermined dactylogyrid allowed the phylogenetic reconstruction of these dactylogyrids. The analysis indicated that *Pavanelliella* sp. n. is closely related to *Pavanelliella takemotoi* and *Pavanelliella pavanellii*, which formed a sister clade to ancylo-discoidines parasites of siluriform fish from the Oriental and Afrotropical regions. The analysis also corroborated the non-monophyly of Ancyrocephalinae, revealing that ancylo-discoidines arose between ancyrocephalines lineages, in a sister relationship to pseudodactylogyrids + marine ancyrocephalines + ancyrocephalines parasites of afrotropical perciforms + dactylogyrids. Cladistical analysis indicates that the haptor anchor/bar complex has been lost several times in the evolutionary history of Dactylogyridae. The analysis also indicated that *Dactylogyrus* is polyphyletic, as *Acolpenteron ureteroecetes* and *Dactylogyroides longicirrus* arose between the three lineages formed by *Dactylogyrus* spp.

6.1. INTRODUCTION

Catfish (Siluriformes) originate in freshwater environments and account for about 3,100 species distributed worldwide [1], representing around one-third of all known freshwater fishes [2]. More than half (55%) of their richness is reported in the Neotropics, where some of the most primitive lineages of siluriforms are recognized [3, 4]. Pimelodidae is one of 15 endemic families of catfishes from the Neotropical region [5] and currently accounts for approximately 134 known species [4]. Despite its diversity, only 25 species of pimelodids have been examined for monogenoidean parasites.

Forty-six species of monogenoids were reported parasitizing pimelodids [6]. Of the species found on the body surface, one was from *Phanerothecioides* Kritsky, Vianna and Boeger, 2007; one was from *Phanerothecium* Kritsky and Thatcher, 1977; and two were from *Scleroductus* Jara and Cone, 1989. Thirty-nine species were reported from the gills: three from *Urocleidoides* Mizelle and Price, 1964; one from *Amphocleithrum* Price and Gonzáles-Romero, 1969; 23 from *Demidospermus* Suriano, 1983; one from *Cosmetocleithrum* Kritsky, Thatcher and Boeger, 1986; three from *Vancleaveus* Kritsky, Thatcher and Boeger, 1986; one from *Unibarra* Suriano and Incorvaia, 1995; and six were from *Amelloblastella* Kritsky, Mendoza-Franco e Scholz, 2000. The remaining, three species of *Pavanelliella* Kritsky and Boeger, 1998, were reported in the nostrils.

Kritsky and Boeger [7] erected *Pavanelliella* to accommodate the new species *Pavanelliella pavanellii* Kritsky and Boeger, 1998, recovered from the nasal cavities of the pimelodid *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix and Agassiz, 1829) (type host) from the Baía River in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil (type locality), and *Calophysus macropterus* (Lichtenstein, 1819) from the Solimões River in the state of Amazonas, Brazil. The genus was characterized by a coiled male copulatory organ (MCO) with counterclockwise rings, an accessory piece non articulated with the MCO, overlapping gonads and the absence of haptoral bars, anchors and hooks 4A [7]. Kritsky and Mendoza-Franco [8] emended the diagnosis of the genus, and described *Pavanelliella scaphiocotylus* Kritsky and Mendoza-Franco, 2003, from the nostrils of the heptapterid catfish, *Rhamdia guatemalensis* (Günther, 1864) from Yucatán, Mexico. Aguiar et al. [9] described *Pavanelliella takemotoi* Aguiar, Ceccarelli and Luque, 2011, and *Pavanelliella laertei* Aguiar, Ceccarelli and Luque, 2011, of pimelodids from the Mogi Guaçu River in the state of São Paulo, Brazil.

The present study addresses the fauna of monogenoids taken from the nasal cavities of pimelodids (12 species) from the Amazon and Paraná Basins and describes one new species of *Pavanelliella* from the Amazon Basin. The molecular data confirmed the validity of these species and allowed the evolutionary history of *Pavanelliella* to be recovered, clarifying its relationship within Dactylogyridae Bychowsky, 1933.

6.2. MATERIAL AND METHODS

6.2.1. Morphological study of the helminths

The male copulatory organ (MCO) length data provided by Aguiar et al. [9] were reviewed here using digital images processed in ImageJ 1.43m.

6.2.2. Molecular analysis of the parasites

Polymerase chain reactions (PCRs) were conducted in two steps. Firstly, using the primers DAC18F1 (5' – AATCAGCTATGGTTCCTTGGAT – 3') (designed for this study) and IR8 (5' – GCTAGCTGCGTTCTTCATCGA – 3') [10], which anneal in the 116 position of the 18S rDNA and the 2440 position of ITS1, respectively. Posteriorly a nested PCR was carried out using the primers 930F (5' – GCATGGAATAATGGAATAGG – 3') [11] and IR8. A quantity of 0.2 mM of each primer and 4 µl of the extracted DNA was used in the reactions, with initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30s, 58°C for 30s, 72°C for 90s, and final elongation at 72°C for 10 min. The nested PCRs were conducted with 1 µl of the product of the PCRs, diluted 1:1 in ultrapure water, with initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30s, 58°C for 30s, 72°C for 60s, and then final elongation at 72°C for 7 min. Sequencing was with the additional use of the primers 1200R (5'–GGGCATCACAGACCTG – 3') [11] and S1 (5' – ATTCCGATAACGAACGAGACT – 3') [12].

6.2.3. Phylogenetic inference

For phylogenetic reconstructions, 96 ssrDNA and ITS-1 sequences of dactylogyrids downloaded from the NCBI database [13] were used. The alignment of these sequences plus those of Dactylogyridae gen. sp., *V. cicinnus* and three of *Pavanelliella* spp. performed in this study were subjected to less stringent g-blocks [14]. Phylogenetic trees were generated from the sequence alignments using Bayesian Inference (BI) and Maximum Likelihood (ML).

BI analysis was carried out using the MrBayes version 3.2 software package [15]. Two independent Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analyses were run for 5,000,000 generations in 5 chains of 1,000,000. Tree sampling was set for 100th generation, MCMC diagnostic for every 1000th generation and the first 25% of the samples were discarded. The nodal support was validated by bootstrap with 1,000 replicates. After phylogenetic inference using the diplectanid *Lamellodiscus echeneis* as an outgroup (not shown), the following analyses were run using the *Onchocleidus similis* sequence as a functional outgroup [16].

6.3. RESULTS

6.3.1. Quantitative descriptors of *Pavanelliella* spp. from the nasal cavities of pimelodid catfishes

Of the 70 fish analyzed, which belonged to 12 species, infestation by at least one species of *Pavanelliella* was observed in the nasal cavities of specimens of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855), *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855), *Pseudoplatystoma tigrinum* (Valenciennes, 1840), *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821), *Pimelodus maculatus* (Lacepède, 1803) and *Pimelodus microstoma* Steindachner, 1877 (Tables 1 and 2). Morphologic and epidemiologic data concerning each *Pavanelliella* species are shown in Table 2. The description of the new *Pavanelliella* species, based on morphologic and molecular data (ssrDNA partial + ITS-1 sequencing), is presented below. Molecular data of *P. pavanellii*, *P. takemotoi* and of Dactylogyridae gen. sp. and *V. cicinnus* are also provided.

6.3.2. Morphological and molecular taxonomy

Taxonomic summary

Class: Monogenoidea Bychowsky, 1937

Subclass: Polyonchoinea Bychowsky, 1937

Order: Dactylogyridea Bychowsky, 1937

Family: Dactylogyridae Bychowsky, 1933

Genus: *Pavanelliella* Kritsky & Boeger, 1998

Species: *Pavanelliella* sp. n. Figures 7 and 9

Type host: *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) (Siluriformes, Pimelodidae).

Portuguese popular name “dourada”.

Site of infection: Nasal cavities.

Type locality: Igarapé Jari, Tapajós River (Amazon basin – sub-basin of the rivers Amazon, Tapajós, Juruena), Santarém, state of Pará (2° 20' 24" N, 54° 53' 59"W).

Prevalence of infection: 9 of 11 of *B. rousseauxii* (82%).

Mean intensity of infection: 6.

Mean abundance of infection: 5.

Comparative measures: Table 2

Description (based on 13 specimens: 6 stained with Gomori's trichrome and 7 mounted in Gray and Wess's medium). Body 565 (428–787; n = 11) long, fusiform, tapering posteriorly, peduncle absent; greatest width of trunk 141 (108–185; n = 8) at level of vaginal pore. Cephalic margin tapered; poorly developed terminal lobes; three bilateral pairs, cup-shaped head organs; cephalic glands unicellular, latero-posterior to pharynx, some near to intestinal bifurcation. Eyes 4, equal, equidistant, 3 eyes sometimes present (2 anterior and 1 anterior or 1 anterior and 2 posterior), as well as just few accessory granules in cephalic region. Pharynx subspherical 30 (24–34; n = 8) in diameter; esophagus moderately long; bifurcate intestinal caeca confluent in posterior trunk after germarium. Haptor 129 (109–141; n = 6) wide, 109 (80–140; n = 8) long, sub circular, suction cup like, margin of haptor delicate, armed with 14 marginally distributed hooks. Hooks 18 (13–22; n = 20) long, tapering proximal and distally, with an erected thumb and a delicate point; filamentous hook loop with about 2/3 of shank length. Gonads overlapping. Testis 58 (35–97; n =

5) long, 26 (18–34; n = 3) wide, elongate piriform, dorsal to germarium; vas deferens looping left intestinal cecum; seminal vesicle a dilatation of vas deferens, sigmoid, lying to midline in anterior trunk. Prostatic reservoir single, saccate. Genital pore opening ventrally, in midline of body, below of the anterior bifurcation of the caeca, anterior to MCO. Genital atrium not muscular. Copulatory complex comprising MCO and accessory piece. MCO sclerotized, 294 (250–363; n = 12) long, tubular, coiled; with 4, but rarely 3 counterclockwise rings, 25 (18–34; n = 12) proximal ring diameter; and with a conical base surrounded by 3 sclerotized flaps (2 proximal and 1 distal). Accessory piece 29 (24–34; n = 12) total length, non-articulated with MCO, comprising a sheath enclosing the distal portion of MCO, distally partite in two parts, one of them enveloping the distal portion of the MCO, the other, shorter and resembling a drop of liquid. Germarium elongate 90 (62–149; n = 7) long, 29 (25–34; n = 4) wide; uterus observed, but oviduct and ootype, not. Vagina sinistral, with sclerotized atrium cup-shaped and without a pre-atrium; vaginal canal sclerotized, sinuous, forming a 0.5–1 loop in distal portion, which expands to open inside the vaginal atrium; seminal receptacle subspherical, overlapping germarium partially. Vitellaria dense, absent in the region of the reproductive organs. Eggs not observed.

Molecular data: partial ssrDNA and ITS-1 sequencing resulted in 929 base pairs (bp) for *Pavanelliella* sp. n., of which 514 bp are from ssrDNA and 415 bp from ITS-1. These sequences did not match any of the others available in the NCBI database in a BLASTn search. Estimates of evolutionary divergence showed that *Pavanelliella* sp. n. was the most divergent species of the genus (Table 3).

Remarks: *Pavanelliella* sp. n. (Figures 7 and 9) can be distinguished from its congeners by the morphology of the male copulatory organ and vaginal canal. The new species possesses a MCO with 4 rings preceding the accessory piece, differing from *P. pavanellii* (2 rings), *P. laertei* (3 rings), *P. takemotoi* (5 rings) and *P. scaphiocotylus* (6 rings) [7, 9] (Figures 7 – 9). *Pavanelliella* sp. n. has a sinuous vaginal canal, which distally forms 0.5–1 loop and expands to open into the vaginal atrium, whereas the remaining species of *Pavanelliella* have a vaginal canal that forms a greater number of loops (*P. pavanellii* = 1 – 3 loops; *P. laertei* = 2 – 3; *P. takemotoi* 2 – 5; *P. scaphiocotylus* = 4 – 5) [7, 9].

Pavanelliella scaphiocotylus, *P. takemotoi* and *P. laertei* have a vaginal canal that forms loops with a greater diameter than the width of the vaginal atrium [8, 9], resembling *Pavanelliella* sp. n. (Figure 7), whereas *P. pavanellii* possesses loops that are smaller than the vaginal atrium [7,

9] (Figure 8). The accessory piece of *Pavanelliella* sp. n. is distally bipartite, and quite different from the accessory pieces of *P. scaphiocotylus*, which have a single distal portion, although it does resemble that of *P. takemotoi* and *P. laertei*, which can also have a bipartite accessory piece [7-9]. While the accessory piece in *P. takemotoi* is simple, in *P. laertei* and *Pavanelliella* sp. n. one of the parts of this piece is slender, longer, and surrounds the distal portion of the MCO, while the other part is shorter. However, while in *Pavanelliella* sp. n. the shorter part resembles a drop of liquid, in *P. laertei* it sometimes resembles a hook. Additionally, the new species can also be differentiated from its congeners by having generally larger measurements (Table 2).

In terms of molecular analysis, *Pavanelliella* sp. n. exhibited differences of 14.4% and 14.6% with *P. pavanellii* and 14.9% with *P. takemotoi* (Table 3) in estimates of evolutionary divergence. These molecular analyses of *Pavanelliella* spp. also support the erection of the new taxon, in addition to the morphologic differences.

***Pavanelliella pavanellii* Kritsky & Boeger, 1998 Figure 8**

Pavanelliella pavanellii: Kritsky and Boeger [7]: 160–163, figs. 1–4 (descr); Aguiar et al. [9]: 216–217, figs. 16–18 (citat); Cohen et al. [6]: 58, fig. 269 (citat).

Type host: *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829).

Type locality: Baia River, Mato Grosso do Sul, Brazil.

Site of infection: Nasal cavities.

Others records: *Calophysus macropterus* (Lichtenstein, 1819), Solimões River, in Manaus, state of Amazonas, Brazil [7]; *Pimelodus maculatus* (Lacepède, 1803), Mogi-Guaçu River, Pirassununga, state of São Paulo, Brazil [9].

Material studied: vouchers CHIOC37559 and CHIOC37560.

Present records: *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855), Lagoon in the Jamanxim River (04° 45' 19" N, 56° 26' 16" W), September 2011, Tapajós River (04° 33' 10" N, 56° 17' 60" W), June 2012, Itaituba, in the state of Pará, Brazil, Igarapé Jari, tributary of Tapajós River (Amazon basin – sub-basin of the rivers Amazon, Tapajós, Juruena), Santarém, in the state of Pará, Brazil (2°20'24"S, 54°53'6059"W), October 2014; *Pseudoplatystoma tigrinum* (Valenciennes, 1840), Igarapé Tracua, tributary of Tapajós river, Santarém, in the state of Pará, Brazil (04° 29' 1" N, 56° 17' 2" W), September 2011, Igarapé Jari, tributary of Tapajós river, Santarém, in the state of Pará, Brazil (2° 20' 24" N, 54° 53' 59"W), October 2014; *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821),

Jamanxim River, tributary of Tapajós river, Itaituba, in the state of Pará, Brazil (05° 14' 07" N, 56° 25' 49" W), September 2011.

Comparative measurements: Table 2.

Remarks. The comparative analysis between the specimens of *Pavanelliella* parasitizing nostrils of *P. punctiferi*, *P. tigrinum* and *Z. zungaro* from the Tapajós River indicated that they are conspecific to *P. pavanellii*, mainly due to sharing general aspects of the morphology of the MCO with 1 – 2 rings, the morphology of the vaginal atrium, and the presence of loops in the distal portion of the vaginal canal which do not surround the vaginal atrium. Despite this, the specimens studied here, differed morphometrically according to the host species in which they were recovered, and from specimens previously studied [7, 9]. Moreover, in the specimens of *P. pavanellii* found associated with pimelodids from the Tapajós River, two loops in the distal portions of the vaginal canal were observed constantly, whereas Aguiar et al. [9] observed 1 – 2 loops when examining the type series of *P. pavanellii* and 2 – 3 in specimens of *P. pavanellii* from the Mogi Guaçu River, in São Paulo. However, the molecular data provided here (Table 3) show low divergence between populations of *P. pavanellii* parasites of *P. punctiferi* and *P. tigrinum*, suggesting that morphometric differences may be the result of the different host colonized.

***Pavanelliella takemotoi* Aguiar, Ceccarelli & Luque, 2011 Figure 9**

Pavanelliella takemotoi: Aguiar et al. [9]: 214–215, figs. 1–8 (descr); Cohen et al. [6]: 58, fig. 270 (citat).

Type host: *Pimelodus maculatus* (Lacepède, 1803).

Type locality: Mogi-Guaçu River (Paraná basin, sub-basin of the Rio Grande), Pirassununga, in the state of São Paulo, Brazil.

Material studied: paratypes CHIOC37568a, CHIOC37571, CHIOC37576b, CHIOC37578 and CHIOC37582a-b.

Present records: *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803, Mogi Guaçu River, Pirassununga São Paulo, Brazil (21° 55' 33" S, 47° 22' 7" W), January 2016.

Comparative measurements: Table 2.

Molecular data: partial *ssrDNA* and *ITS-1* sequencing resulted in 912 bp for *P. takemotoi*. The *ssrDNA* sequence was 516 bp and the *ITS-1* sequence 396 bp. These sequences did not match any other available in the NCBI database in a BLASTn search. The estimates of evolutionary divergence showed that *P. takemotoi* was closest to *P. pavanellii* (Table 3).

Remarks: the specimens of *Pavanelliella* parasites of *Pi. maculatus* examined here are clearly conspecific with *P. takemotoi*, mainly due to sharing the general morphology of the MCO, with 2–5 rings preceding the accessory piece; of the vaginal atrium, which was boot-shaped; and by the presence of 2–5 loops in the distal portion of the vaginal canal surrounding the vaginal atrium (Figure 9). However, Aguiar et al. [9] did not find that the rings around the vaginal atrium of *P. takemotoi* were formed by the distal portion of the vaginal canal, which was observed in the present study through the proteinase K method. Furthermore, the molecular divergences observed between *P. takemotoi* and *Pavanelliella* sp. n. (14.9%) and between *P. takemotoi* and *P. pavanellii* (4.6–4.8%) (Table 3) support the validity of *P. takemotoi*.

***Pavanelliella laertei* Aguiar, Ceccarelli and Luque, 2011 Figure 9**

Pavanelliella laertei: Aguiar et al. [9]: 216–217, figs. 9–15 (descr); Cohen et al. [6]: 58, fig. 268 (citat).

Type host: *Pimelodus microstoma* Steindachner, 1877.

Type locality: Mogi-Guaçu River, Pirassununga, in the state of São Paulo, Brazil.

Material studied: paratypes CHIOC37562-64 and CHIOC37566

Present record: *Pimelodus microstoma* Steindachner, 1877, Mogi Guaçu River, Pirassununga São Paulo, Brazil (21° 55' 33" S, 47° 22' 7" W), April 2012.

Comparative measurements: Table 2.

Remarks: the specimens analyzed in the present study were characterized by a MCO with 2–3 rings preceding the accessory piece; a cup-shaped vaginal atrium; loops with a larger diameter than the width of the vaginal atrium in the distal, or less frequently in the medial portion of the vaginal canal (Figure 9). Such characters confirmed that these specimens are conspecific with *P. laertei*. However, Aguiar et al. [9] erred in stating that this species does not have a vaginal atrium. The present study revealed that this species has a cup-shaped vaginal atrium, which is proportionally smaller than the vaginal atrioms of *P. pavanellii*, *P. scaphiocotylus* and *Pavanelliella* sp. n., and generally surrounded by loops formed by the vaginal canal (Figure 9). *Pavanelliella laertei* is morphologically closer to *P. scaphiocotylus*, *P. takemotoi* and *Pavanelliella* sp. n. from which it can be distinguished by the number of MCO rings; the number of loops in the vaginal canal; and by the morphology of the vaginal atrium, as can be seen in the taxonomic key provided below.

Dichotomous key for species of *Pavanelliella*

1. Smaller number of rings in the MCO preceding the accessory piece = 1; minimum number of loops of the vaginal canal = 1 *Pavanelliella pavanellii*.

Smaller number of rings in the MCO preceding the accessory piece = 2; minimum number of loops of the vaginal canal = 2 2.

Smaller number of rings in the MCO preceding the accessory piece = 3; minimum number of loops of the vaginal canal = 0.5 *Pavanelliella* sp. n.

Smaller number of rings in the MCO preceding the accessory piece = 5; minimum number of loops of the vaginal canal = 4 *Pavanelliella scaphiocotylus*.

2(1). Vaginal atrium cup-shaped; maximum number of loops of the vaginal canal = 3; hooks with erected thumb *Pavanelliella laertei*.

Vaginal atrium boot-shaped; maximum number of loops of the vaginal canal = 5; hooks with straight thumb *Pavanelliella takemotoi*.

Additional SSU rDNA ITS1 sequences provided

Dactylogyridae gen. sp. and *V. cicinnus*, parasites from the gills of *Ph. hemioliopterus*, Igarapé Jari, Tapajós river (Sub-Basin Amazonas, Tapajós, Juruena), Santarém, state of Pará, Brazil (2°20'23.76"S, 54°53'59.28"W), in October 2014.

Table 2 Measurements (μm) and epidemiologic data about *Pavanelliella* species, parasites of catfish from Brazil.

	<i>Pavanelliella pavanelli</i>					<i>Pavanelliella scaphiocotylus</i>	<i>Pavanelliella takemotoi</i>	<i>Pavanelliella laertei</i>	<i>Pavanelliella</i> sp. n. ¹
	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> , <i>Calophrys macropterus</i> [7]	<i>Pimelodus maculatus</i> [9]	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i> Present study	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i> Present study	<i>Zungaro. Zungaro</i> Present	<i>Rhamdia guatemalensis</i> [8]	<i>Pimelodus maculatus</i> [9]	<i>Pimelodus microstoma</i> [9]	
BL	424 (306–514; n = 22)	340 (250–451; n = 9)	395 (351–450; n = 9)	340 (230–443; n = 10)	359 (331–431; n = 12)	518 (384–602; n = 12)	426 (246–580; n = 19)	334 (274–374; n = 7)	565 (428–787; n = 11)
BW	124 (82–162; n = 21)	102 (69–126; n = 19)	117 (84–166; n = 9)	95 (61–144; n = 10)	111 (91–134; n = 12)	80 (69–92; n = 12)	140 (86–240; n = 19)	135 (92–159; n = 4)	141 (108–185; n = 8)
PH	24 (19–28; n = 22)	19 (13–26; n = 4)	24 (20–28; n = 8)	22 (14–40; n = 10)	28 (19–40; n = 11)	30 (26–33; n = 11)	23 (14–36; n = 22)	25 (20–30; n = 5)	30 (24–34; n = 8)
HaL	–	60 (48–77; n = 7)	74 (52–97; n = 9)	69 (47–95; n = 10)	78 (64–91; n = 11)	108 (84–135; n = 11)	59 (46–69; n = 15)	51 (42–66; n = 5)	109 (80–140; n = 8)
HaW	19 (15–20; n = 18)	88 (87–120; n = 12)	94 (351–450; n = 8)	84 (56–139; n = 9)	96 (90–109; n = 13)	122 (102–140; n = 11)	82 (51–122; n = 15)	70 (60–79; n = 2)	129 (109–141; n = 6)
HL	18 (17–19; n = 25)	12 (8–14; n = 7)	17 (14–19; n = 8)	16 (14–18; n = 9)	18 (13–21; n = 16)	14 (13–15; n = 16)	16 (13–21; n = 96)	14 (11–17; n = 23)	18 (13–22; n = 20)
MCOL	161 (140–175; n = 7)	121 (103–149; n = 19)	181 (137–220; n = 9)	170 (100–234; n = 10)	136 (92–173; n = 24)	–	241 (161–305; n = 7) ¹	237 (177–316; n = 4) ¹	294 (250–363; n = 12)
FRD	24 (21–28; n = 30)	19 (13–24; n = 7)	27 (22–35; n = 9)	23 (18–29; n = 9)	24 (19–28; n = 21)	19 (16–23; n = 9)	19 (16–27; n = 29)	18 (17–20; n = 6)	25 (18–34; n = 12)
APL	44 (35–52; n = 15)	27 (18–48; n = 4)	34 (22–41; n = 10)	32 (23–39; n = 8)	36 (21–44; n = 12)	27 (24–29; n = 6)	27 (21–40; n = 25)	20 (18–21; n = 3)	29 (24–34; n = 12)
TL	53, 54; n = 2	35, 39; n = 2	53 (45–66; n = 4)	48 (36–66; n = 8)	42 (40–44; n = 11)	–	67 (42–104; n = 5)	30 (20–43; n = 3)	58 (35–97; n = 5)
TW	22, 24; n = 2	11, 14; n = 2	31 (21–49; n = 3)	19 (8–27; n = 8)	12 (11–13; n = 13)	–	20 (19–27; n = 5)	17 (8–29; n = 3)	26 (18–34; n = 3)
GL	67 (46–78; n = 5)	55 (40–77; n = 4)	76 (63–104; n = 5)	68 (28–104; n = 8)	68 (62–78; n = 19)	60 (51–72; n = 9)	64 (45–104; n = 7)	57 (38–86; n = 3)	90 (62–149; n = 7)
GW	31 (22–36; n = 5)	16 (9–23; n = 4)	29 (22–36; n = 3)	30 (13–492; n = 8)	19 (15–21; n = 8)	27 (21–35; n = 8)	18 (6–30; n = 7)	18 (10–29; n = 3)	29 (25–34; n = 4) ¹
Egg	–	–	55 x 74	–	–	–	–	–	–
P%	–	14	67	61	50	–	35	14	82
MAI	–	0.2	11	20	1.5	–	2.3	1.5	6
MII	–	1.25	16.5	32	3	–	0.8	0.2	5

Body long (BL), Body wide (BW), Pharynx diameter (PH), Haptor long (HaL), Haptor wide (HaW), Hook long (HL), Male copulatory organ long (MCOL), First ring diameter (FRD), Accessory piece long (APL), Accessory piece largest space occupied in the body (APLS), Testis long (TL), Germarium long (GL), Germarium wide (GW). Prevalence (P%), Mean abundance of infection (MAI), Mean intensity of infection (MII). ¹ These data were performed in present study.

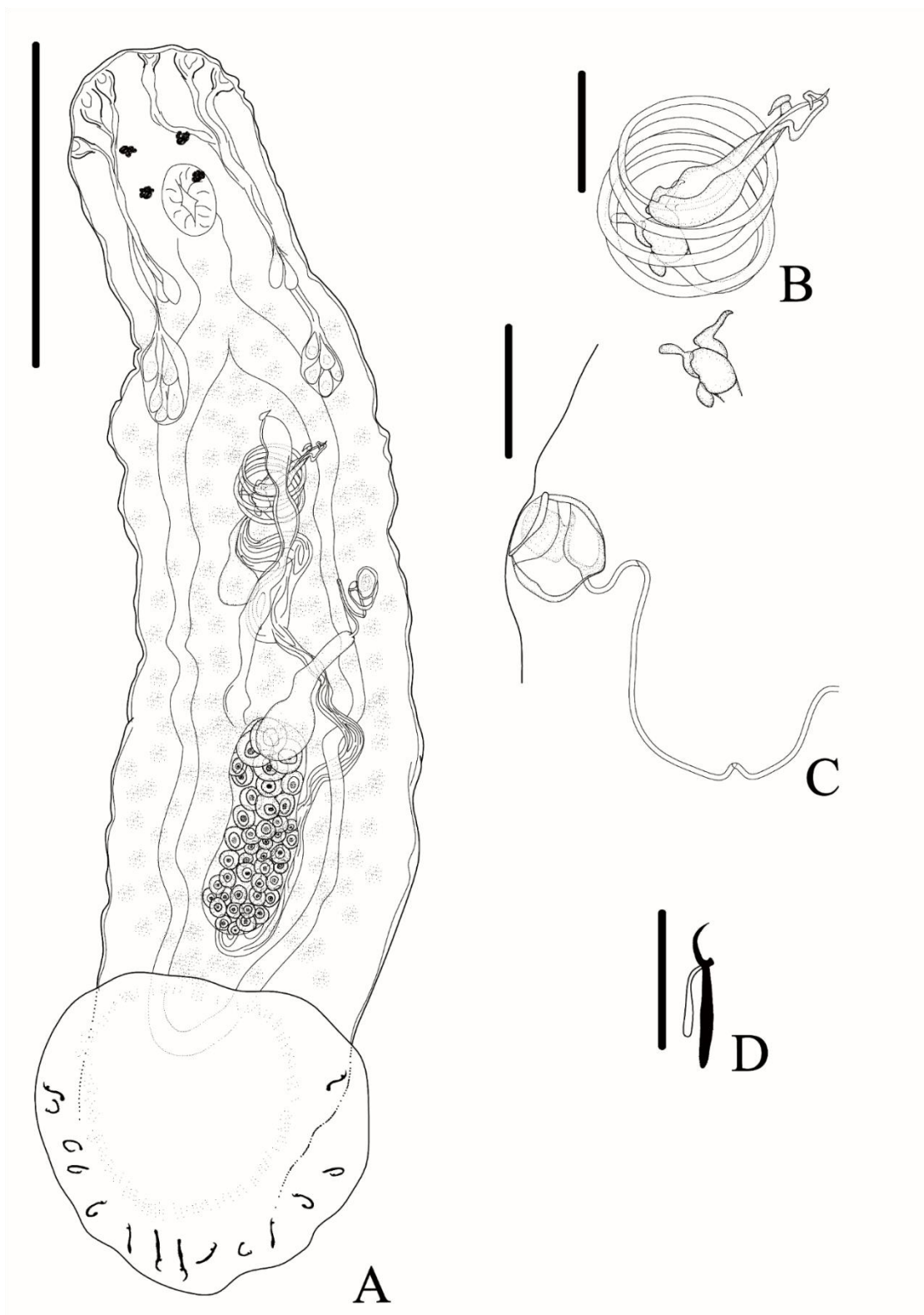


Figure 7 *Pavanelliella* sp. n.. A: whole composite drawn. B: copulatory complex. C: vagina in dorsal view. D: Hook. Scale bar = 150 μ m (A), 20 μ m (B – D).

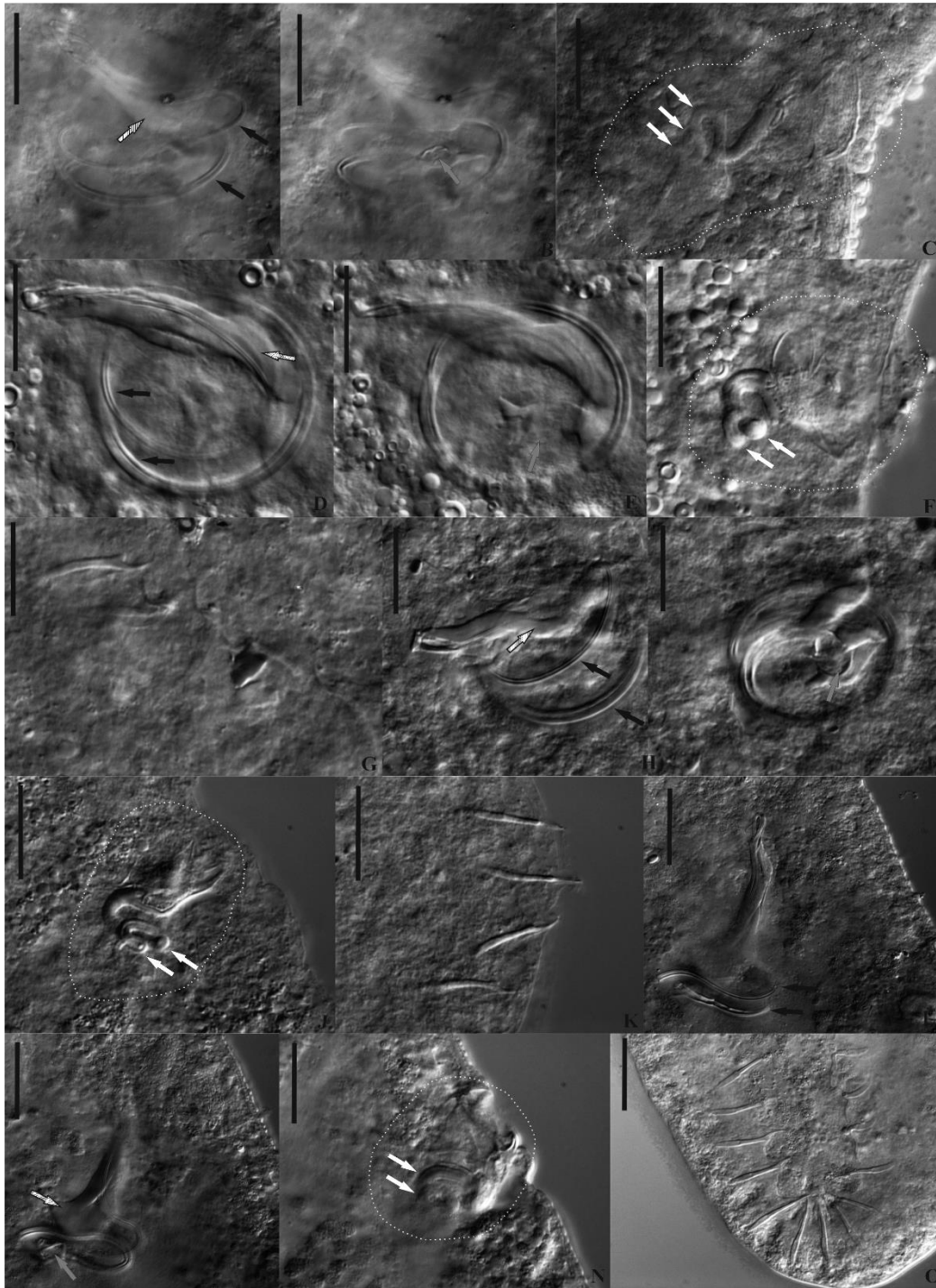


Figure 8 *Pavanelliella pavanellii* parasite of: *Pimelodus maculatus*. A: copulatory complex ventral view (CHIOC37560). B: dorsal view C: vagina (CHIOC37559). *Pseudoplatystoma punctifer*. D copulatory complex in ventral view (PTJ1403-2). E: dorsal view. F: vagina G: hook (PTJ1118-1). *Pseudoplatystoma tigrinum*. H copulatory complex in ventral view (PTJ1187-7). I: dorsal view. J: vagina (PTJ1130-49). K: hook. *Zungaro zungaro*. L: copulatory complex in ventral view (PTJ1156-1). M: dorsal view. N: vagina. O: hook. Arrows: striped (accessory piece), black (MCO - male copulatory organ), gray (base of MCO) and white (vaginal canal). Scale bar = 20 μ m

Figure 9 *Pavanelliella* sp. n.: A: copulatory complex in ventral view (PTJ1413-3). B: dorsal view. C: vagina (PTJ1412-4). D: hook (PTJ1414-2). *Pavanelliella takemotoi*. E: copulatory complex in lateral view (CHIOC37571). F: dorsal view (CHIOC37576b). G: vagina in dorsal view (CHIOC37582b). H: vagina in ventral view. I: hook. *Pavanelliella laertei*. J: copulatory complex in ventral view (CHIOC37563). K: dorsal view. L: vagina in ventral view (CHIOC37562). M: vagina in dorsal view. N: vagina (CHIOC37566). O: vagina (PMG1202). P: hook (CHIOC37564). Scale bar = 20 μ m (A – C, E – L, N – P), 10 μ m (D, M)

Table 3 Estimates of evolutionary divergence between four sequences of ssrDNA partial and ITS-1 of three species of *Pavanelliella*. The upper triangle shows the number of base differences among the sequences. In the lower triangle is the difference in relative frequency rate of nucleotide substitutions

	1	2	3	4
1 <i>Pavanelliella</i> sp. n. (<i>B. rosseauxii</i>)		79	80	82
2 <i>Pavanelliella pavannellii</i> (<i>P. punctifer</i>)	14,4		1	28
3 <i>Pavanelliella pavannellii</i> (<i>P. tigrinum</i>)	14,6	0,1		29
4 <i>Pavanelliella takemotoi</i> (<i>P. maculatus</i>)	14,9	4,6	4,8	

6.3.4. Phylogenetic inference

The phylogenetic inference was based on 754 characters for 102 operational taxonomic units (OTU). This matrix was subjected to both phylogenetic inferences, automatically setting the best evolutionary model of nucleotide substitution as the general time reversible (GTR), with the submodel G+I+F for the ML and the submodel 121324 for the BI. The BI resulted in a 50% majority-rule consensus tree for 37,501 samples from 75,002 trees read. In the BI tree (Figure 10), eleven lineages can be distinguished. *Ancyrocephalus* spp. appears as sister lineage to all the remaining dactylogyrids. *Ligictaluridus pricei* (Mueller, 1936) appeared as a sister group to the remaining nine lineages (A–I), five of which (A–B, D–F), had members allocated in the Ancyrocephalinae, and these results were strongly supported by at least the PP.

Lineage A, represented by *V. cicinnus* and Dactylogyridae gen. sp. is basal to the lineages B–I, and in the lineage of *Pavanelliella*, *Pavanelliella* sp. n. was sister to the two other *Pavanelliella* species, with a closer relationship to *P. takemotoi* (Figure 10). Lineage C was composed of two clades of ancylodiscoines, the smallest of which, composed of *Schilbetrema* sp., *Quadriacanthus* sp. and two *Thaparocleidus* species and was sister to the larger clade composed exclusively of *Thaparocleidus*. These ancylodiscoines arose as sister group to the large clade composed by the D–F and G–I lineages (Figure 10). In lineage D, there were two pseudodactylogyrids, which are sisters to the other ancyrocephalin lineages (E + F). The

dactylogyrines were composed by three lineages (G–I), and with the exception of *Acolpenteron ureteroecetes* Fischthal and Allison, 1940, and *Dactylogyroides longicirrus* (Tripathi, 1959), which appeared respectively in the G and I lineages, Figure 10), they were mostly represented of *Dactylogyrus* species.

ML and BI analysis converged in a similar tree topology (Figure 10) and differed between one another only in relationships within lineages F and I, leading us to present only a BI tree. In the ML tree (not shown), all relationships within the F lineage were resolved and resulted in five clades, with some differences in comparison with the BI tree (Figure 10). In the ML tree, there was a resolved clade with *Cichlidogyrus dracolemma* Řehulková, Mendlová & Šimková, 2013, *Cichlidogyrus longicirrus* Paperna, 1965 + *Cichlidogyrus falciferi* Dossou & Birgi, 1984, arising as a sister group for the remaining four clades of the F lineage. Nevertheless, most of the incongruences between the ML and BI trees are within the I lineage. In one of these incongruences, the ML tree revealed that *Dactylogyrus fallax* Wagener, 1857, was not a sister group to the clade composed of *Dactylogyrus vistulae* Prost, 1957, *Dactylogyrus alatus* Linstow, 1878, *Dactylogyrus sphyrna* Linstow, 1878, and *Dactylogyrus similis* Wagener, 1909, and that this last clade had a sister relationship with the remaining eleven species of *Dactylogyrus* of this group. The relationship of *Dactylogyrus propinquus* Bychowsky, 1931 + *Dactylogyrus chranilowi* Bychowsky, 1931, was resolved in the ML tree, in which this clade diverged as a sister group to *Dactylogyrus zandti* Bychowsky, 1933 + *Dactylogyrus wunderi* Bychowsky, 1931. Yet, *Dactylogyrus auriculatus* (Nordmann, 1832), emerged in the ML tree in a sister relationship with *Dactylogyrus falcatus* (Wedl, 1857), between all the *Dactylogyrus* spp. of this lineage (I) and the clade composed of *D. longicirrus*, *Dactylogyrus amphibothrium* Wagener, 1857, and *Dactylogyrus hemiamphibothrium* Ergens, 1956. However, in the ML tree, *D. longicirrus* appeared to be a sister to *Dactylogyrus amphibothrium* Wagener, 1857 + *Dactylogyrus hemiamphibothrium* Ergens, 1956, in a sister clade to the remaining species of this lineage.

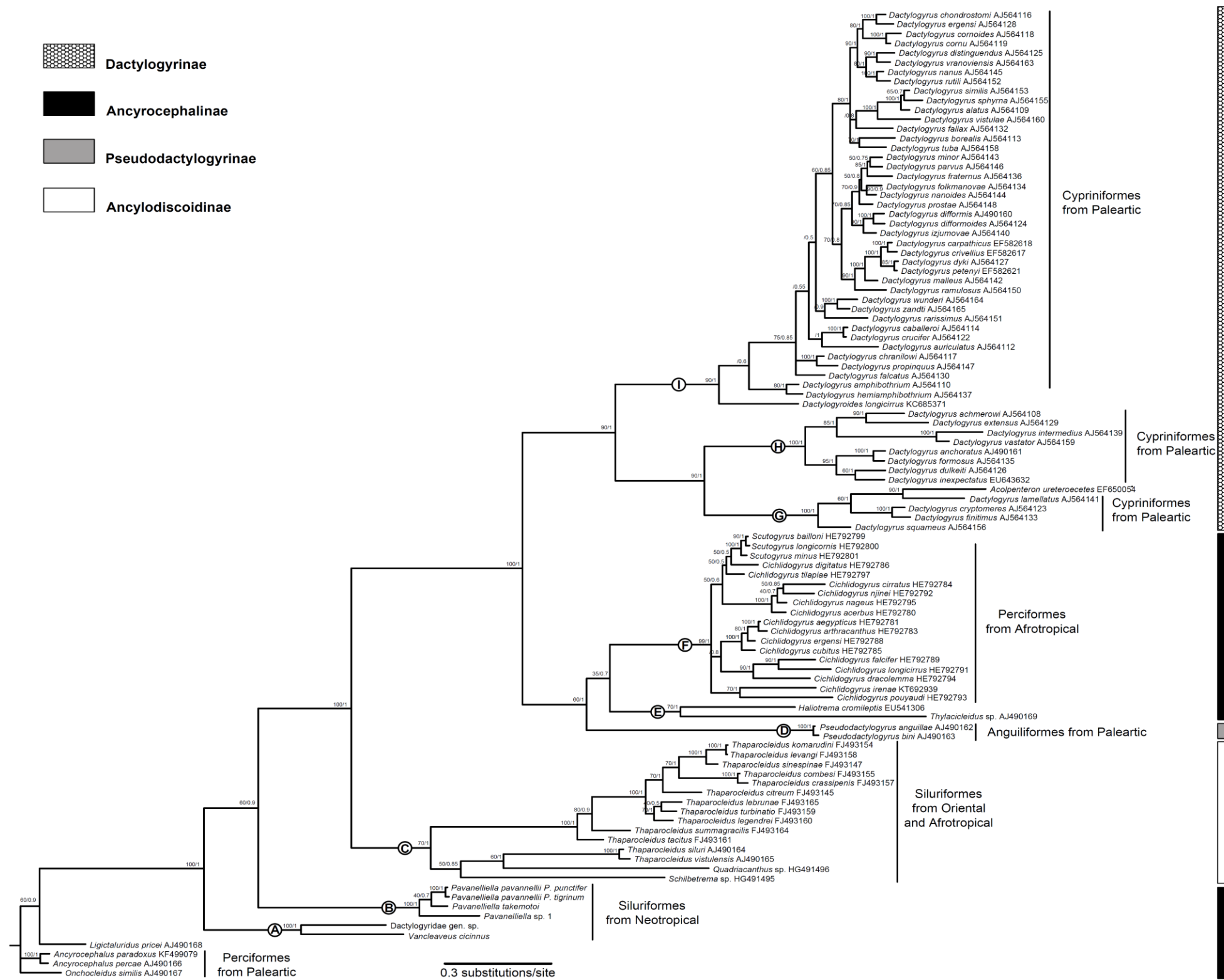


Figure 10 Phylogenetic reconstruction of *Pavanelliella* spp. based on SSU rDNA partial and ITS1 gene sequence. The tree is a 50% majority-rule consensus tree, as suggested by Bayesian Inference. Nodes are supported by 1000 replicates of Bootstrapping from Maximum Likelihood and by Posterior Probability from Bayesian Inference

6.4. DISCUSSION

Other authors have described a number of interesting models encompassing dactylogyrids and their different lineages from teleost hosts when investigating issues relating to evolutionary aspects [17-24]. The system composed of dactylogyrids parasites of Neotropical siluriforms also offers an opportune way to test such historical association hypotheses. Firstly, because the dactylogyrids and the catfishes are both presumed to constitute natural groups [2, 10, 25-30]. Additionally, some lineages of dactylogyrids are known to occur exclusively in the Neotropical region, like most of their catfish hosts. However, the lineages of the Neotropical dactylogyrids have only recently been scrutinized with empirical tests, while phylogenetic inferences regarding the dactylogyrid parasites of Neotropical catfish have been made even more recently [25, 31-37].

Until now only four species of *Pavanelliella* have been identified, all from the Neotropics [7-9], suggesting a low diversity for this genus. The present study, however, describes the fifth species of *Pavanelliella* (*P. jarii* sp. n.) based on morphology and molecular data. There are authors suggesting a much greater diversity than is currently imagined for dactylogyrid parasites of Neotropical catfish [9, 25, 38, 39], and probably we can also hope new descriptions of species for *Pavanelliella*. In the Neotropical region, there are more than 1500 spp. of catfishes, and at least pimelodids and heptapterids (~300 spp.) are potential hosts to *Pavanelliella* spp. Furthermore, we provide six new ssrDNA partial + ITS-1 sequences, four of the *Pavanelliella* species, one of Dactylogyridae gen. sp. and another of *V. cicinnus*, all parasitizing pimelodids. These data enhance the molecular data previously provided for Neotropical dactylogyrids, such as LSU rDNA by Mendoza-Palmero et al. [25], Franceschini et al. [36] and Acosta et al. [37], total ssrDNA by Müller et al. [35], and COI by Gasques et al. [32].

Species of the *Pavanelliella* have fewer morphologic characters for comparison with each other [9], as they do not possess the haptor bar/anchor complex [8, 9] that is synapomorphic of Dactylogyrynea Bychowsky, 1937 [26, 40-42]. However, within Dactylogyrynea, as well as *Pavanelliella*, the anchor/bar complex has not been observed in five other genera of dactylogyrids [43-47] and two of pseudomurraytrematids [48, 49]. Malmberg [50] proposed to group all members of Dactylogyrynea without an anchor/bar complex in the “Ananchorea”, although this proposal has not been accepted [51]. In any organism group it is hard to determine if a character (*e.g.* the absence

of anchor/bar complex in monogenoids) is homologous or homoplasious, unless it has been scrutinized under phylogenetic hypothesis [40, 52]. The present phylogenetic study, based on the positions of the *Pavanelliella* lineage and of *A. ureteroecetes*, allowed the inference that the anchor/bar complex was independently and secondarily lost in the evolutionary history of Dactylogyridae.

Between the dactylogyrids in which the anchor/bar complex was not observed are included species of *Kritskyia* Kohn, 1990 and *Telethecium* Kritsky, Van Every and Boeger, 1996. Unfortunately, the absence of sequences in the NCBI database did not allow the evolutionary history of such genera to be reconstructed, which would have been interesting due to their morphological closeness to *Pavanelliella* [7]. In addition to these genera is a dactylogyrid which is morphologically close to *Telethecium* and *Pavanelliella*, found parasitizing the nostrils of ctenolucids from the Tapajós River (unpublished data), and which also lacks the anchor/bar complex. A future, more comprehensive study of these dactylogyrids should include these genera in its analysis to elucidate the relationship between them.

The results obtained here converge with previous morphological and molecular analyses by using different markers (*i.e.* 18S rDNA, 28S rDNA, ITS1, 16S, as well as combinations of the same), which indicated the non-monophyly of the Ancyrocephalinae [10, 23, 25, 26, 29, 30, 53-56]. However, while the basal paraphyly of the freshwater ancyrocephalines recovered in the present study (Figure 10) may be an artefact caused by the outgroup selected, all the adjacent relationships remained the same as those verified in the first inference made to functionally select the outgroup. In the majority of the previous molecular phylogenetic inferences, the overall recovered topology, as in the present study, encompassed a group composed of freshwater ancyrocephalines, which was a sister group to the ancylodiscoidines and had an unresolved relationship with the pseudodactylogyrids, dactylogyrids and the marine lineages of ancyrocephalines (*e.g.* *Ligophorus* Euzet and Suriano, 1977, *Euryhaliotrema* Kritsky and Boeger, 2002 and *Aliatrema* and *Thylacicleidus* Wheeler and Klassen, 1988) [10, 25, 29, 30, 54, 56].

The absence of consensus on the relationship between Dactylogyridae Bychowsky, 1933, Pseudodactylogyridae Ogawa, 1986, and the lineages of marine ancyrocephalines is pervaded by concurrent hypotheses based, in almost every case, as in our hypothesis, on recovered relationships, which lack strong branch support. The hypothesis provided in the present study (Figure 10) regarding these groups corroborates the most frequent hypothesis, and suggests that dactylogyrids

are a sister group to pseudodactylogyrines + marine ancyrocephalines + ancyrocephalines parasites of Afrotropical cichlids from brackish water and freshwater (mostly *Cichlidogyrus* spp. and *Scutogyrus* spp.) [30, 54, 56]. However, Plaisance et al. [29] and Mendoza-Palmero et al. [25] recovered a similar topology, through which they hypothesized that Dactylogyrinae + Pseudodactylogyrinae form a sister group to the lineages of marine ancyrocephalines + afrotropical ancyrocephalines. Ancyrocephalines parasites of Afrotropical cichlids arising between lineages of marine ancyrocephalines have been frequently reported [10, 30, 54, 56], and may have an evolutionary history linked to secondary dispersion to freshwater environments and the colonization of cichlids, as previously indicated [17].

Synonymy, as well as splitting genera based on phylogenetic inferences, has been proposed as a way to organize some of the groups within Dactylogyridae. Among the genera evaluated in the present study, it is inferred that at least two require revision. The relationships observed between species of *Cichlidogyrus* and *Scutogyrus* were uncertain, agreeing with the data that reveal conflicts within these genera [17, 22, 23, 56, 57], although there is no doubt about their close phylogenetic relationship, morphological character sharing, and evolutionary biology [17, 22, 23, 25, 56-64]. However, there remains no consensus about whether *Scutogyrus* is monophyletic [17, 57] as there is regarding the unnatural origin of *Cichlidogyrus* [23, 25, 56, 57]. The results depicted here allow only the inference that *Cichlidogyrus* is not monophyletic.

Several studies have identified the monophyly of *Dactylogyrus* [30, 65-67], and the phylogenetic analyses (BI and ML) of the present study showed similar results to evaluations previously carried out for this genus [19, 30], where it was possible to observe three main lineages composed mostly of parasites of cypriniforms from the Palearctic region. However, in the present study *A. ureteroecetes*, a parasite of a perciform, appears in the G lineage in a sister relationship along with *Dactlogyrus lamellatus* Achmerow, 1952, while in the I lineage, *Dactylogyroides longicirrus* (Tripathi, 1959), a parasite of a cypriniform, arises as a sister group to the large clade composed of *Dactylogyrus* spp. Although the present phylogenetic proposal provides strong evidence that *Dactylogyrus* is not monophyletic, it is necessary to expand the database with sequences of other markers, especially with the addition of members of other subfamilies anteriorly recognized as circumscribed in this family [26], and other species of the genera *Acolpenteron* Fischthal and Allison, 1940, *Pseudoacolpenteron* Bychowsky and Gussev, 1955 and *Pellucidhaptor* Price and Mizelle, 1964 [30], which can provide new insights.

The present study revealed the relationship of Neotropical lineages of ancyrocephalines from freshwater environments with other dactylogyrids through sequencing of the partial 18S rDNA and the ITS1. The evolutionary relationships hypothesized that *Pavanelliella* is monophyletic and, in spite of its phylogenetic affinities to Dactylogyridae gen. sp. and *V. cicinnus*, the early-diverging branch in which these monogenoids arose suggests that Neotropical ancyrocephalines colonized catfish more than once in their evolutionary history.

6.5. REFERENCES

- [1] C.J. Ferraris, Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types, Citeseer, 2007.
- [2] R. Diogo, Morphological evolution, aptations, homoplasies, constraints, and evolutionary trends: catfishes as a case study on general phylogeny and macroevolution, Science Pub Incorporated, 2005.
- [3] J.P. Sullivan, J. Muriel-Cunha, J.G. Lundberg, Phylogenetic relationships and molecular dating of the major groups of catfishes of the Neotropical superfamily Pimelodoidea (Teleostei, Siluriformes), Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 162 (2013) 89–110.
- [4] G. Helfman, B.B. Collette, D.E. Facey, B.W. Bowen, The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology, John Wiley & Sons, 2009.
- [5] R.E. Reis, S.O. Kullander, C.J. Ferraris, Check list of the freshwater fishes of South and Central America, Edipucrs, 2003.
- [6] S.C. Cohen, M.C.N. Justo, A. Kohn, South American Monogenoidea Parasites of Fishes, Amphibians and Reptiles, Oficina de Livros, Rio de Janeiro, 2013.

- [7] D.C. Kritsky, W.A. Boeger, Neotropical Monogenoidea. 35. *Pavanelliella pavanellii*, a new genus and species (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae) from the nasal cavities of siluriform fishes in Brazil, *Journal of Helminthological Society of Washington* 65 (1998) 160–163.
- [8] D.C. Kritsky, E. Mendoza-Franco, Neotropical Monogenoidea. 42. *Pavanelliella scaphiocotylus* sp. nov. (Dactylogyridae) from the Nasal Cavity of the Guatemalan Chulin, *Rhamdia guatemalensis* (Siluriformes: Heptapteridae), from a Cenote on the Yucatán Peninsula, Mexico, *Comparative Parasitology* 70 (2) (2003) 136–139.
- [9] J.C. Aguiar, P.S. Ceccarelli, J.L. Luque, Two new species of *Pavanelliella* (Monogenea, Dactylogyridae) parasitic on pimodolid fishes from Mogi Guaçu river, Southeastern Brazil, and notes on the morphology of *P. pavanellii*, *Neotropical Helminthology* 5 (2) (2011) 213–224.
- [10] A. Šimková, L. Plaisance, I. Matějsovà, S. Morand, O. Verneau, Phylogenetic relationships of the Dactylogyridae Bychowsky, 1933 (Monogenea: Dactylogyridea): the need for the systematic revision of the Ancyrocephalinae Bychowsky, 1937, *Systematic Parasitology* 54 (2003) 1–11.
- [11] D.T.J. Littlewood, P.D. Olson, Small subunit rDNA and the platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise, in: D.T.J. Littlewood, R.A. Bray (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*, Taylor & Francis London, 2001, p. 380.
- [12] N.D. Sinnappah, L.H. Lim, K. Rohde, R. Tinsley, C. Combes, O. Verneau, A paedomorphic parasite associated with a neotenic amphibian host: phylogenetic evidence suggests a revised systematic position for Sphyrnurae within anuran and turtle Polystomatoineans, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18 (2) (2001) 189–201.
- [13] L.Y. Geer, A. Marchler-Bauer, R.C. Geer, L. Han, J. He, S. He, C. Liu, W. Shi, S.H. Bryant, The NCBI biosystems database, *Nucleic Acids Research* (2009) gkp858.

- [14] G. Talavera, J. Castresana, Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments, *Systematic Biology* 56 (2007) 564–577.
- [15] F. Ronquist, M. Teslenko, P. van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard, J.P. Huelsenbeck, MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space, *Systematic Biology* 61 (3) (2012) 539–542.
- [16] L.E. Watrous, Q.D. Wheeler, The out-group comparison method of character analysis, *Systematic Biology* 30 (1) (1981) 1–11.
- [17] M. Mendlová, Y. Desdevise, K. Cívánová, A. Pariselle, A. Šimková, Monogeneans of West African cichlid fish: evolution and cophylogenetic interactions, *PLoS One* 7 (5) (2012) e37268.
- [18] M. Mendlová, A. Šimková, Evolution of host specificity in monogeneans parasitizing African cichlid fish, *Parasites & Vectors* 7 (2014) 69.
- [19] A. Šimková, S. Morand, E. Jobet, M. Gelnar, O. Verneau, R. Poulin, Molecular phylogeny of congeneric monogenean parasites (*Dactylogyrus*): a case of intrahost speciation, *Evolution* 58 (5) (2004) 1001–1018.
- [20] A. Šimková, C. Serbielle, A. Pariselle, M.P. Vanhove, S. Morand, Speciation in *Thaparocleidus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitizing Asian Pangasiid catfishes, *BioMed Research International* 2013 (2013) 353956.
- [21] A. Šimková, O. Verneau, M. Gelnar, S. Morand, Specificity and Specialization of Congeneric Monogeneans Parasitizing Cyprinid Fish, *Evolution* 60 (5) (2006) 1023–1037.
- [22] L. Pouyaud, E. Desmarais, M. Deveney, A. Pariselle, Phylogenetic relationships among monogenean gill parasites (Dactylogyridea, Ancyrocephalidae) infesting tilapiine hosts (Cichlidae): systematic and evolutionary implications, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38 (1) (2006) 241–249.

- [23] X.-Y. Wu, X.Q. Zhu, M.Q. Xie, A.X. Li, The radiation of *Haliotrema* (Monogenea: Dactylogyridae: Ancyrocephalinae): molecular evidence and explanation inferred from LSU rDNA sequences, *Parasitology* 132 (Pt 5) (2006) 659–668.
- [24] X.-Y. Wu, X. Ming-Quan, L. An-Xing, Initial radiation of *Dactylogyrus* and coevolution with the dactylogyrid-cyprinid association, *Acta Zoologica Sinica* 53 (4) (2007) 651–658.
- [25] C.A. Mendoza-Palmero, I. Blasco-Costa, T. Scholz, Molecular phylogeny of Neotropical monogeneans (Platyhelminthes: Monogenea) from catfishes (Siluriformes), *Parasites & Vectors* 8 (164) (2015) 1–11.
- [26] D.C. Kritsky, W.A. Boeger, The phylogenetic status of the Ancyrocephalidae Buchowsky, 1937 (Monogenea, Dactylogyroidea), *Journal of Parasitology* 75 (1989) 207–211.
- [27] J.G. Lundberg, M.W. Littmann, Family Pimelodidae (Long-wiskered catfish), in: R.E. Reis, S.O. Kullander, C.J. Ferraris Jr (Eds.), *In Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* Edipucrs, Porto Alegre, 2003, p. IV+729.
- [28] J.G. Lundberg, J.P. Sullivan, M. Hardman, Phylogenetics of the South American Catfish Family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) using Nuclear and Mitochondrial Gene Sequences, *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 161 (1) (2011) 153–189.
- [29] L. Plaisance, D.T.J. Littlewood, P.D. Olson, S. Morand, Molecular phylogeny of gill monogeneans (Platyhelminthes, Monogenea, Dactylogyridae) and colonization of Indo-West Pacific butterflyfish hosts (Perciformes, Chaetodontidae), *Zoologica Scripta* 34 (4) (2005) 425–436.
- [30] A. Šimková, I. Matejusova, C.O. Cunningham, A molecular phylogeny of the Dactylogyridae sensu Kritsky & Boeger (1989) (Monogenea) based on the D1-D3 domains of large subunit rDNA, *Parasitology* 133 (Pt 1) (2006) 43–53.

- [31] M.V. Domingues, W.A. Boeger, Neotropical Monogeneoidea. 47. Phylogeny and coevolution of species of *Rhinoxenus* (Platyhelminthes, Monogeneoidea, Dactylogyridae) and their Characiformes hosts (Teleostei, Ostariophysi) with description of four new species, *Zoosystema* 27 (3) (2005) 441–467.
- [32] L.S. Gasques, R.J. Graça, S.M.A.P. Prioli, R.M. Takemoto, A.J. Prioli, Molecular characterization of *Urocleidoides cuiabai* and *U. malabaricus* (Monogenea: Dactylogyridae) from the trahira fish *Hoplias aff. malabaricus* in the Paraná River, Brazil, *Journal of Helminthology* (2015) 1–5.
- [33] R.B. Narciso, H. Brandão, F.H. Yamada, R.C. Benine, R.J. da Silva, A new species of *Trinibaculum* (Monogenea: Dactylogyridae) parasite of the gills of *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819)(Characiformes: Characidae) in a neotropical river, São Paulo state, Brazil, *Neotropical Helminthology* 8 (1) (2014) 85–95.
- [34] E.F. Mendoza-Franco, V.M. Vidal-Martínez, Phylogeny of species of *Sciadicleithrum* (Monogeneoidea: Ancyrocephalinae), and their historical biogeography in the Neotropics, *Journal of Parasitology* 91 (2) (2005) 253–259.
- [35] M.I. Müller, P.S. Ceccarelli, M.T. Ueta, Supplementary studies on *Anacanthorus penilabiatus* and *Mymarothecium viatorum* (Monogenea: Dactylogyridae) from *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes: Serrasalminidae) in Brazil, *Acta Parasitologica* 61 (3) (2016) 508–515.
- [36] L. Franceschini, A. Zago, M. I. Müller, C. Francisco, R. M. Takemoto, R. J. da Silva, Morphology and molecular characterization of *Demidospermus spirophallus* n. sp., *D. prolixus* n. sp. (Monogenea: Dactylogyridae) and a redescription of *D. anus* in siluriform catfish from Brazil, *Journal of Helminthology* (2017) 1–16.
- [37] A.A. Acosta, L. Franceschini, A.C. Zago, T. Scholz, R.J. da Silva, Six new species of *Heteropriapulus* (Monogenea: Dactylogyridae) from South American fishes with an amended diagnosis to the genus, *Zootaxa* 4290 (3) (2017) 459–482.

- [38] C.A. Mendoza-Palmero, T. Scholz, E.F. Mendoza-Franco, R. Kuchta, New species and geographical records of dactylogyrids (Monogenea) of catfish (Siluriformes) from the Peruvian Amazonia, *Journal of Parasitology* 98 (3) (2012) 484–497.
- [39] P.B. Cepeda, J.L. Luque, Three new species of *Demidospermus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic on *Brachyplatystoma filamentosum* (Siluriformes: Pimelodidae) from the Araguaia River, Brazil, *Journal of Parasitology* 96 (5) (2010) 869–873.
- [40] W.A. Boeger, D.C. Kritsky, Phylogenetic relationships of the Monogenoidea, *Systematics Association Special Volume* 60 (2001) 92–102.
- [41] W.A. Boeger, D.C. Kritsky, Phylogeny and a revised classification of the Monogenoidea Bychowsky, 1937 (Platyhelminthes), *Systematic Parasitology* 26 (1) (1993) 1–32.
- [42] W.A. Boeger, D.C. Kritsky, Coevolution of the Monogenoidea (Platyhelminthes) based on a revised hypothesis of parasite phylogeny, *International Journal for Parasitology* 27 (12) (1997) 1495–1511.
- [43] J.H. Fischthal, L.N. Allison, *Acolpenteron ureteroecetes* ng, n. sp., a monogenetic trematode from the ureters of black basses, *Journal of Parasitology* 26 (Suppl) (1940) 34–35.
- [44] J. Mizelle, C. Price, Studies on monogenetic trematodes. XXVIII. Gill parasites of the piranha with proposal of *Anacanthorus* gen. n, *The Journal of Parasitology* (1965) 30–36.
- [45] D.C. Kritsky, V.E. Thatcher, New monogenetic trematodes from freshwater fishes of Western Colombia, with the proposal of *Anacanthoroides* gen. n. (Dactylogyridae), *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 43 (2) (1976) 129–134.
- [46] A. Kohn, *Kritskyia moraveci* n. g. n. sp. (Monogenea: Dactylogyridae) from the urinary bladder and ureters of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Pimelodidae) in Brazil, *Systematic Parasitology* 17 (2) (1990) 81–85.

- [47] D.C. Kritsky, L.R. Van Every, W. Boeger, Neotropical Monogenoidea. 27. Two new species of *Telethecium* gen. n. from the nasal cavities of Central Amazonian fishes and a redescription of *Kritskyia moraveci* Kohn, 1990 (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae), Journal of the Helminthological Society of Washington 63 (1996) 35–41.
- [48] J.F. Mueller, Additional species of North American Gyrodactyloidea (Trematoda), The American Midland Naturalist 19 (1) (1938) 220–235.
- [49] P.D. Leiby, D.C. Kritsky, C.A. Peterson, Studies on helminths of North Dakota. III. Parasites of the bigmouth buffalo, *Ictiobus cyprinellus* (Val.), with the description of three new species and the proposal of *Icelanonchohaptor* gen. n.(Monogenea), The Journal of Parasitology (1972) 447–454.
- [50] G. Malmberg, On the ontogeny of the haptor and the evolution of the Monogenea, Systematic Parasitology 17 (1) (1990) 1–65.
- [51] P.I. Gerashev, Dactylogyrids (Monogenea, Dactylogyridea) with unusual number of the anchors, their origin and phylogenetic significance, Parazitologiya 32 (2002) 146–157.
- [52] D. Brooks, D. McLennan, Parascript, Smithsonian series in Comparative Evolutionary Biology, Washington and London (1993).
- [53] B.E. Bychowsky, Monogenetic trematodes: their systematics and phylogeny, American Institute of Biological Sciences (1961).
- [54] I. Blasco-Costa, R. Miguez-Lozano, V. Sarabeev, J.A. Balbuena, Molecular phylogeny of species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) and their affinities within the Dactylogyridae, Parasitology International 61 (4) (2012) 619–27.

- [55] B.T. Dang, A. Levsen, C. Schander, G.A. Bristow, Some *Haliotrema* (Monogenea: Dactylogyridae) from cultured grouper (*Epinephelus* Spp.) with emphasis on the phylogenetic position of *Haliotrema cromileptis*, *Journal of Parasitology* 96 (1) (2010) 30-39.
- [56] M. Mendlová, A. Pariselle, M. Vyskocilova, A. Šimková, Molecular phylogeny of monogeneans parasitizing African freshwater Cichlidae inferred from LSU rDNA sequences, *Parasitology Research* 107 (6) (2010) 1405–13.
- [57] X.-Y. Wu, X.Q. Zhu, M.Q. Xie, A.X. Li, The evaluation for generic-level monophyly of Ancyrocephalinae (Monogenea, Dactylogyridae) using ribosomal DNA sequence data, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44 (2) (2007) 530–544.
- [58] E. Řehulková, M. Mendlova, A. Simkova, Two new species of *Cichlidogyrus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitizing the gills of African cichlid fishes (Perciformes) from Senegal: morphometric and molecular characterization, *Parasitology Research* 112 (4) (2013) 1399-1410.
- [59] F.D.M. Mandeng, C.F.B. Bilong, A. Pariselle, M.P. Vanhove, A.R.B. Nyom, J.-F. Agnèse, A phylogeny of *Cichlidogyrus* spp.(Monogenea, Dactylogyridea) clarifies a host-switch between fish families and reveals an adaptive component to attachment organ morphology of this parasite genus, *Parasites & Vectors* 8 (1) (2015) 1–12.
- [60] A. Pariselle, L. Euzet, *Scutogyrus* gen. n. (Monogenea, Ancyrocephalidae) for *Cichlidogyrus longicornis minus* Dossou, 1982, *C. l. longicornis*, and *C. I. gravivaginus* Paperna and Thurston, 1969, with description of three new species parasitic on African cichlids, *Journal of Helminthological Society of Washington* 62 (1995) 157–173.
- [61] A. Pariselle, C.F.B. Bilong, L. Euzet, Four new species of *Cichlidogyrus* Paperna, 1960 (Monogenea, Ancyrocephalidae), all gill parasites from African mouthbreeder tilapias of the genera *Sarotherodon* and *Oreochromis* (Pisces, Cichlidae), with a redescription of *C. thurstonae* Ergens, 1981, *Systematic Parasitology* 56 (3) (2003) 201–210.

- [62] A. Pariselle, L. Euzet, Five new species of *Cichlidogyrus* (Monogenea: Ancyrocephalidae) from *Tilapia brevimanus*, *T. buttikoferi* and *T. cessiana* from Guinea, Ivory Coast and Sierra Leone (West Africa), *Folia Parasitologica* 45 (1998) 275–282.
- [63] A. Pariselle, L. Euzet, *Cichlidogyrus* Paperna, 1960 (Monogenea, Ancyrocephalidae): gill parasites from West African Cichlidae of the subgenus *Coptodon* Regan, 1920 (Pisces), with descriptions of six new species, *Systematic Parasitology* 34 (2) (1996) 109–124.
- [64] A. Pariselle, L. Euzet, Four new species of *Cichlidogyrus* (Monogenea: Ancyrocephalidae), gill parasites of *Tilapia cabrae* (Teleostei: Cichlidae), with discussion on relative length of haptoral sclerites, *Folia Parasitologica* 50 (3) (2003) 195–201.
- [65] H.R. Chiary, A. Chaudhary, H.S. Singh, Phylogenetic analysis of the *Dactylogyroides longicirrus* (Monogenea: Dactylogyridae) based on the 18S and ITS 1 ribosomal genes, *Bioinformation* 9 (5) (2013) 250–254.
- [66] M. Nitta, K. Nagasawa, A new species of *Dactylogyrus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic on an endangered freshwater fish, *Rhodeus atremius atremius*, endemic to Japan, *Parasitology International* 65 (5) (2016) 483–487.
- [67] H.S. Singh, A. Chaudhary, Genetic characterization of *Dactylogyroides longicirrus* (Tripathi, 1959) Gussev, 1976 by nuclear 28S segment of ribosomal DNA with a morphological redescription, *Scientia Parasitologica* 11 (3) (2010) 119–127.

7. CAPÍTULO 2. INFERÊNCIA FILOGENÉTICA DE *AMELOBLASTELLA* SP. N. (MONOGENOIDEA, DACTYLOGYRIDAE), PARASITA DE *PHRACTOCEPHALUS HEMIOLIOPTERUS* DA BACIA DO RIO TAPAJÓS, BRASIL

Formatado de acordo com normas da ABNT

RESUMO

Estudos recentes utilizando análises moleculares têm contribuído para ampliar o conhecimento sobre história evolutiva de dactilogirídeos parasitas de peixes Neotropicals. No presente estudo descreve-se uma nova espécie do gênero *Ameloblastella* (*Ameloblastella* sp. n.), para a qual é proposta uma hipótese de relacionamento filogenético baseada no sequenciamento do gene 28S rDNA. Essa espécie foi encontrada parasitando as brânquias de exemplares de pirarara (*Phractocephalus hemioliopus*) coletados no Rio Tapajós (Bacia Amazônica – subbacia dos rios Amazonas, Tapajós e Juruena) e representa um novo registro de localidade e de hospedeiro para *Ameloblastella*. A nova espécie pode ser diferenciada de outras espécies do gênero com base no número de anéis do órgão copulador masculino (OCM), e na morfologia das barras, âncoras e ganchos haptorais. *Ameloblastella* sp. n. faz parte do clado de espécies de Dactylogyridae parasitas de siluriformes neotropicais, o qual é grupo irmão do clado composto por ancirocefalíneos de água doce da Região Paleártica. A hipótese filogenética aqui proposta sugere que diferentes linhagens de dactilogirídeos colonizaram siluriformes de maneira independente em mais de um evento de colonização. Essa hipótese também abrange a possibilidade de terem ocorrido alguns eventos de dispersão secundária de ambientes marinhos para ambientes de água doce.

7.1. INTRODUÇÃO

Ameloblastella Kritsky, Mendoza-Franco & Scholz, 2000, compreende parasitas dactilogirídeos até o momento restritos à bagres da região Neotropical (Price, 1938; Kritsky e Thatcher, 1976; Suriano e Incorvaia, 1995; Kritsky *et al.*, 2000; França *et al.*, 2003; Mendoza-Franco e Scholz, 2009; Monteiro *et al.*, 2010). As espécies do gênero não possuem olhos, apresentam gônadas sobrepostas e compartilham uma projeção anteromedial na barra haptorial ventral (Kritsky *et al.*, 2000). Espécies de *Ameloblastella* também compartilham um órgão copulador masculino (OCM) enrolado, com anéis em sentido anti-horário e com uma peça acessória articulada com a base do OCM por meio de um ligamento copulatório (Kritsky *et al.*, 2000). Esta série homóloga de caracteres sustenta a monofilia do gênero, recentemente provada por meio de inferência molecular filogenética (Mendoza-Palmero *et al.*, 2015).

Inicialmente, *Cleidodiscus* (= *Ameloblastella*) *chavarriai* (espécie tipo) (Price, 1938), *Urocleidoides* (= *Ameloblastella*) *mamaevi* (Kritsky & Thatcher, 1976) e *Vancleaveus* (= *Ameloblastella*) *platensis* (Suriano & Incorvaia, 1995) foram transferidas para o gênero *Ameloblastella*. Posteriormente, *Pseudovancleaveus* França, Isaac, Pavanelli & Takemoto, 2003, foi sinonimizado com *Ameloblastella*, o qual agora também abrange *Ameloblastella paranaensis* (França, Isaac, Pavanelli & Takemoto, 2003). Mais tarde, foram descritas *Ameloblastella unapi* Mendoza-Franco & Scholz, 2009, e *Ameloblastella satoi* Monteiro, Kritsky & Brasil-Sato, 2010. E recentemente, Mendoza-Franco *et al.* (2016) descreveram *Ameloblastella edentensis* Mendoza-Franco, Mendoza-Palmero e Scholz, 2016, sinônimo de *Ameloblastella* sp. 16 de Mendoza-Palmero *et al.* (2015), parasita de *Hypophthalmus edentatus* Spix & Agassiz, 1829, *Ameloblastella peruensis* Mendoza-Franco, Mendoza-Palmero e Scholz, 2016, parasita de *Hypophthalmus* sp., *Ameloblastella formatrium* Mendoza-Franco, Mendoza-Palmero e Scholz, 2016, encontrada em um pimelodídeo não identificado e *Ameloblastella unapioides* Mendoza-Franco, Mendoza-Palmero e Scholz, 2016, sinônimo de *Ameloblastella* sp. 8 de Mendoza-Palmero *et al.* (2015), parasita de *Sorubim lima* (Bloch & Schneider, 1801), todas de Iquitos, no Peru.

A diversidade de *Ameloblastella*, representada por dez espécies, foi revelada por meio de exames parasitológicos empreendidos em peixes siluriformes de 12 espécies. Apenas *A. chavarriai* foi descrita parasitando um heptapterídeo da América Central. As demais espécies foram reportadas associadas a pimelodídeos da América do Sul. O presente estudo descreve uma nova

espécie de *Ameloblastella* parasita de *Phractocephalus hemioliopterus* (Bloch & Schneider, 1801), popularmente conhecida como pirarara. Baseado no sequenciamento parcial do gene 28S rDNA é proposto uma hipótese de relacionamento filogenético para essa nova espécie, a qual avalia seu posicionamento dentro da família Dactylogyridae Bychowsky, 1933.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1. Análises moleculares

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram usados 3 µl do DNA. As PCRs foram feitas com os *primers* 1200F (5' – CAGGTCTGTGATGCCC – 3') [13] e D2 (5' – TGGTCCGTGTTTCAAGAC – 3') (Wu *et al.*, 2005), que anelam nas posições 1795 do gene 18S rDNA e 820 28S rDNA, respectivamente. A otimização das PCRs foi feita a partir de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 45s, 50°C por 30s, 72°C durante 90s, e com um alongamento final a 72°C por 7 min. No contexto do presente estudo, foram usados apenas os *primers* para sequenciar os domínios D1 – D3 do gene 28S rDNA. Portanto, além do *primer* D2, foram adicionalmente usados os *primers* C1 (5' – ACCCGCTGAATTTAAGCAT – 3') (Wu *et al.*, 2005) e o 28SR1 (5' – GCTTCGATGTTGGGCTARTCTC – 3') (Dang *et al.*, 2010) para o sequenciamento.

7.2.2. Inferência filogenética

Para as reconstruções filogenéticas, sequências do gene 28S rDNA de 78 dactilogirídeos, de quatro diplectanídeos e de um pseudomurraitrematídeo foram baixadas da base de dados do NCBI (Geer *et al.*, 2009) para construção do conjunto de dados. O alinhamento dessas sequências, mais a sequência de *Ameloblastella* sp. n. foi submetido à seleção menos rigorosa de blocos de genes, os quais selecionaram áreas que continham caracteres informativos. As árvores filogenéticas foram geradas por meio de Inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML).

Duas cadeias independentes de Markov Monte Carlo (MCMC) foram corridas para 700.000 gerações em 7 cadeias de 100.000. A amostragem das árvores foi configurada para cada 100ª geração e o diagnóstico para cada 1000ª, sendo as primeiras 25% das amostras descartadas. A ML

foi configurada conforme descrito na metodologia geral. Quatro espécies de Diplectanidae, *Sinodiplectanotrema argyromus* Zhang in Zhang, Yang & Liu, 2001, *Murraytrema pricei* Bychowsky & Nagibina, 1977, *Pseudorhabdosynochus epinepheli* (Yamaguti, 1938) e *Pseudorhabdosynochus lantauensis* (Beverley-Burton & Suriano, 1981) e uma de Pseudomurraytremaidae, *Pseudomurraytrema* sp., foram usadas como grupos externos.

7.3. RESULTADOS

Do total de 12 exemplares de *P. hemioliopterus* examinados, 8 tiveram as brânquias infestadas por *Ameloblastella* sp. n. A descrição da nova espécie de *Ameloblastella*, baseada na morfologia e em dados moleculares (28S rDNA), é apresentada abaixo.

7.3.1. Taxonomia morfológica e molecular

Sumário taxonômico

Classe: Monogenoidea Bychowsky, 1937

Subclasse: Polyonchoinea Bychowsky, 1937

Ordem: Dactylogyridea Bychowsky, 1937

Família Dactylogyridae Bychowsky, 1933

Gênero: *Ameloblastella* Kritsky, Mendoza-Franco & Scholz, 2000

Espécie: *Ameloblastella* sp. n. (Figuras 11 e 12)

Hospedeiro tipo: *Phractocephalus hemioliopterus* (Bloch & Schneider, 1801) (Siluriformes, Pimelodidae).

Localidade tipo: Igarapé Jari, Comunidade Jari do Socorro, Rio Tapajós (Bacia Amazônica – subbacia dos rios Amazonas, Tapajós e Juruena), Santarém, Pará, Brasil (2° 20' 24" S – 54° 53' 59" O).

Localidade adicional: Parque Nacional da Amazônia, Rio Tapajós, Itaituba (04° 33' 10 S" – 56° 17' 60" O).

Sítio de infestação: Brânquias.

Prevalência de infestação: 67%.

Intensidade média de infestação: 3.

Abundância média de infestação: 2.

Diagnose baseada em 9 espécimes: (6 corados com tricrômico de Gomori e montados em goma de damar e 3 montados em meio de Grey e Wess): Corpo 674 (299–888; n = 9) comprimento total, fusiforme, afunilando posteriormente, pedúnculo ausente; Maior largura 232 (155–300; n = 9) ao nível médio do corpo. Região cefálica sem lobos, contendo 9 pares de órgãos cefálicos; glândulas cefálicas presente. Olhos e grânulos acessórios ausentes. Faringe sub-esférica 75 (56–122; n = 9) diâmetro; esôfago não observado; ceco intestinal confluyente na região posterior do corpo após o germário. Haptor 121 (108–136; n = 9) largura, 66 (42–90; n = 9) comprimento, relativamente pequeno, quase não se destaca do corpo. Barra ventral 36 (31–46; n = 9) comprimento, distância entre extremidades 35 (28–45; n = 9), levemente curvada, com extremidades mais estreitas e com uma projeção medial. Barra dorsal 26 (23–29; n = 9) comprimento, distância entre extremidades 23 (21–26; n = 9), quase reta, com uma expansão medioposterior e duas subdistais, uma em cada extremidade. Âncora ventral 25 (20–31; n = 9) comprimento, 16 (13–22; n = 6) largura; âncora dorsal 26 (21–30; n = 9) comprimento, 14 (13–16; n = 3) largura; ambas com raízes superficiais e profundas moderadamente desenvolvidas, lâmina recurvada, diferindo uma da outra na espessura da lâmina, com a ventral sendo mais grossa. Ganchos par 1 – 2 23 (19–26; n = 9), pares 3 – 4 25 (19–32; n = 13), pares 5 – 7 27 (20–36; n = 20), com uma expansão distal, polegar ereto e uma ponta robusta; filamentos do gancho com cerca de 2/3 do comprimento da canela do grâncho. Gônadas sobrepostas, testículo 174 (141–249; n = 5) comprimento, 67 (43–86; n = 5) largura, alongado, dorsal ao germário; vesícula seminal sigmoide, repousa região anterior à esquerda da linha média do corpo, vaso deferente dá uma volta no ceco intestinal esquerdo. Reservatório prostático saciforme com uma câmara dorsal e uma ventral. Órgão copulador masculino (COM) 832 (659–995; n = 9) comprimento total, 24 (19–29; n = 9) diâmetro do anel proximal, tubular, fino, enrolado com 11 anéis; com base expandida com paredes mais fortemente esclerotizadas. Peça acessória 35 (22–49; n = 9) comprimento total, compreendendo uma bainha que envolve a porção distal do COM, com uma projeção auricular distal e proximalmente bipartida, com uma das partes estreita, da qual surge o ligamento copulatório. Germário oval 226 (124–309; n = 9) comprimento, 96 (59–118; n = 9) largura; útero observado, mas oviduto e oótipo não. Vagina

sinistra, com átrio esclerotizado em forma de copo e pré-átrio não esclerotizado; canal vaginal esclerotizado, sinuoso, com cinco voltas proximais, sendo maiores as três mais proximais, e com uma volta pequena distal, depois da qual o canal vaginal entra no átrio vaginal, e se expande adquirindo uma forma de martelo. Receptáculo seminal não observado, mas na mesma região do corpo foi observada uma massa globular esclerotizada. Vitelária densa, ausente na região dos órgãos reprodutivos.

Comentários

Ameloblastella sp. n. pode ser diferenciada das demais espécies do gênero pelo número de anéis do OCM (*i.e.* 11 anéis). Apenas *A. unapi* (13 – 14 anéis), se aproxima de *Ameloblastella* sp. n., uma vez que as demais espécies do gênero possuem até no máximo 5,5 anéis no OCM (Kritsky e Thatcher, 1976; Suriano e Incorvaia, 1995; França *et al.*, 2003; Mendoza-Franco e Scholz, 2009; Monteiro *et al.*, 2010; Mendoza-Franco *et al.*, 2016). O canal vaginal sinuoso contendo laços, é um caráter que também é compartilhado entre *Ameloblastella* sp. n. e *A. unapi*. Há cinco laços proximais grandes e um pequeno laço distal no canal vaginal de *Ameloblastella* sp. n. e de *A. unapi*. No entanto, os laços proximais do canal vaginal de *Ameloblastella* sp. n. são mais distantes do laço distal, comparado a distância entre os laços proximais e distal do canal vaginal de *A. unapi*. Ainda, o laço distal do canal vaginal de *Ameloblastella* sp. n. é menor que a expansão em forma de martelo formada na porção distal do seu canal vaginal dentro do átrio vaginal, enquanto que em *A. unapi*, essas estruturas possuem aproximadamente o mesmo tamanho.

A maioria das espécies de *Ameloblastella* compartilham uma entre duas configurações possíveis de morfologia de âncoras. Algumas espécies como *A. platensis*, *A. paranaensis*, *A. unapi*, *A. edentensis*, *A. formatrium* e *A. unapioides*, possuem âncoras ventrais e dorsais com lâminas longas e retas, formando um ângulo de aproximadamente 90° com as pontas das âncoras, que são curtas. As demais espécies, *A. chavarriai*, *A. mamaevi*, *A. satoi*, *A. peruensis* e *Ameloblastella* sp. n., têm âncoras com lâminas curtas e recurvadas e com pontas longas. Este caráter também contribui para distinguir *Ameloblastella* sp. n. de *A. unapi*.

Monteiro *et al.* (2010) sugeriram que *A. paranaensis* poderia ser um sinônimo júnior de *A. platensis*. Essas espécies compartilham muitos caracteres, e o que as distingue é a forma da barra ventral, em “V” em *A. paranaensis* e levemente reta em *A. platensis* (Suriano e Incorvaia, 1995;

França *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2010). Este é um caráter variável, que pode sofrer alterações de indivíduo para indivíduo e ambas espécies podem ser encontradas nas mesmas espécies de hospedeiros, embora *A. platensis* tenha sido registrada apenas na bacia do Rio de La Plata na Argentina. Portanto há possibilidade de que esses táxons sejam sinônimos, porém uma análise mais aprofundada, com consulta de material tipo e taxonomia molecular, é necessária para definir esse impasse.

Foi recuperada uma sequência de 820bp para *Ameloblastella* sp. n. A busca conduzida por meio do BLASTn não retornou nenhuma sequência perfeitamente equivalente ou com 100% de similaridade com a sequência de *Ameloblastella* sp. n., embora tenha ocorrido um alinhamento com sequências de espécies do gênero, com 88% de similaridade com *Ameloblastella* sp. 8 (= *A. unapioides*) de Mendoza-Palmero *et al.* (2015). As análises de divergência evolutiva (Tabela 4) mostraram que *Ameloblastella* sp. e *Ameloblastella* sp. 8 de Mendoza-Palmero *et al.* (2015) são as espécies mais próximas de *Ameloblastella* sp. n., divergindo 4,1% na taxa relativa de substituição de nucleotídeos, enquanto *A. chavarriai* é a espécie mais distante (divergência de 9,4%). Além dos caracteres morfológicos, as diferenças moleculares observadas também contribuem para suportar a ereção do novo táxon.

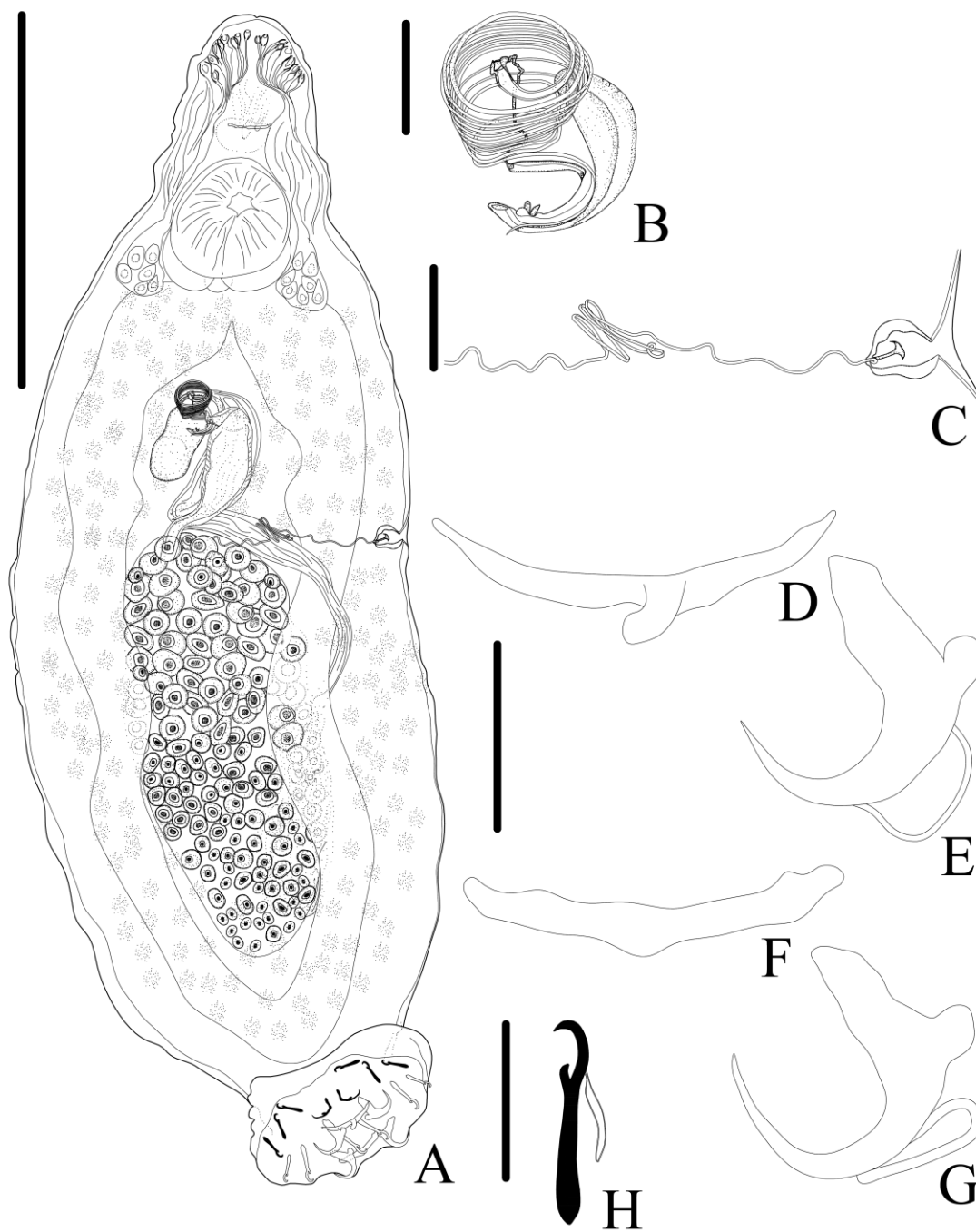


Figura 11 *Ameloblastella* sp. n. A Desenho composto do verme inteiro, B Complexo copulatório, C Vagina, D Barra ventral, E Âncora ventral, F Barra dorsal G, Âncora dorsal, H Gancho. Barra de escala = 200 μ m (A), 25 μ m (C), 20 μ m (B), 15 μ m (D – G, H).

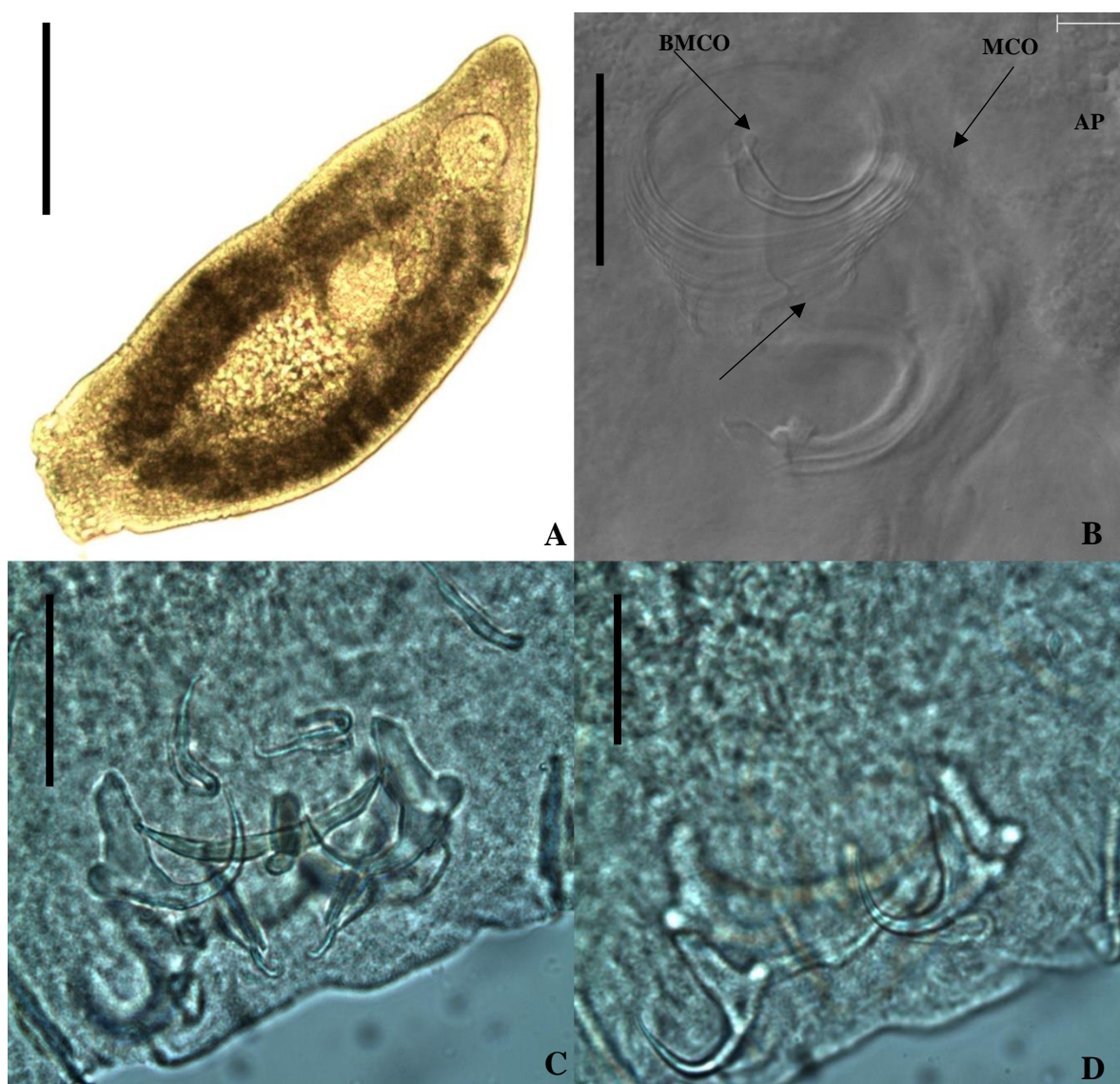


Figura 12 *Ameloblastella* sp. n. parasita de brânquias de *Phractocephalus hemioliopus*, da bacia do rio Tapajós, Pará, Brasil. A Helminto inteiro, B Complexo copulatório, órgão copulador masculino (COM), base do COM (BOCM), ligamento copulatório (CL) e peça acessória (PA), C Barra e âncora ventral, D barra e âncora dorsal. Barra de escala = 200 μm (A), 20 μm (B), 25 μm (C–D).

Tabela 4 Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências parcial do gene 28S rDNA de seis espécies de *Ameloblastella*. O triângulo superior mostra o número de diferenças de bases por entre as sequências. No triângulo inferior esta a diferença na taxa de frequência relativa de substituições de nucleotídeos

	1	2	3	4	5	6
1 <i>Ameloblastella</i> sp. n.		22	10	10	21	18
2 <i>Ameloblastella chavarriai</i> KP056251	9,4		26	20	26	23
3 <i>Ameloblastella</i> sp. KP056253	4,1	11,1		15	24	21
4 <i>Ameloblastella</i> sp. 8 KP056254	4,1	8,4	6,2		21	18
5 <i>Ameloblastella</i> sp. 16 KP056255	8,8	11	10,2	8,8		8
6 <i>Ameloblastella</i> sp. 23 KP056233	7,5	9,7	8,9	7,5	4,3	

7.3.2. Inferência filogenética

Na presente análise filogenética, um alinhamento não ambíguo com 84 unidades taxonômicas operacionais (OTU) produziu uma matriz abrangendo 638 caracteres informativos. Esta matriz foi submetida a duas inferências filogenéticas, as quais definiram automaticamente o melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos como o *General Time Reversible* (GTR), com o submodelo G + I + F para a ML e o submodelo 123421 para a BI. A BI resultou em uma árvore de consenso de maioria selecionada entre 10.052 amostras de 14.002 árvores lidas.

A árvore de ML (Figura 13) exhibe três principais linhagens de dactilogirídeos (A – C) fortemente suportadas. A linhagem basal (A), irmã das linhagens B + C, é composta por dois clados fortemente suportados, ao menos pela Probabilidade Posterior (PP), ambos formados por ancirocefalíneos de água doce. Em um dos clados da linhagem A, *Unibarra paranoplatensis* Suriano & Incorvaia, 1995 aparece como grupo irmão das demais espécies neotropicais, *Vancleaveus janauacaensis* Kritsky, Thatcher & Boeger, 1986, e um subclado composto pelas 6 espécies de *Ameloblastella*, onde *Ameloblastella* sp. n. surge como espécie irmã de *Ameloblastella* sp. Na linhagem B, duas espécies de *Aphanoblastella* aparecem como grupo irmão para três clados de Ancylo-discoidinae e de um clado de ancirocefalíneos de água doce ((*Aphanoblastella aurorae*, *Aphanoblastella* sp. 3), ((*Thaparocleidus* spp.), ((*Quadriacanthus kobiensis*, *Bychowskyella*

pseudobagri), ((*Schilbetrema* sp., *Chauhanellus* spp.), (*Cosmetoclethrur* sp., (*Demidospermus* spp.)))). A linhagem C é composta por quatro linhagens proximamente relacionadas, e abrange os dactilogiríneos, pseudodactilogiríneos e ancirocefalíneos marinhos e de água doce ((dactilogiríneos, ancirocefalíneos marinhos), ((pseudodactilogiríneos, *Ancyrocephalus morgurndae*), ((ancirocefalíneos marinhos), (*Cichilogyrus* spp., *Scutogyrus* spp.))).

As árvores de ML e BI foram congruentes na maioria das relações filogenéticas observadas, por isso exibimos apenas a árvore de ML. As incongruências observadas recaíram sobre as relações vistas entre as linhagens D – G e dentro das linhagens F – G. Não houve resolução entre as linhagens D – G na árvore de BI (resultados não exibidos), uma vez que elas surgiram em uma politomia. Dentro da linhagem F, o clado formado pelas espécies *Ergenstrema mugilis* + *Ligophorus vanbenedenii* e *Haliotrematoides guttati* + *Haliotrematoides spinatus* (Figura 13) foi dissolvido na árvore de BI. As espécies *E. mugilis* + *L. vanbenedenii* surgiram como grupo irmão do clado formado por espécies de *Euryhaliotrema*, enquanto que *H. guttati* + *H. spinatus* agruparam como grupo irmão do clado formado por *Metahaliotrema mizellei* + *Protogyrodactylus alienus* + *Protogyrodactylus hainanensis*, proximamente relacionados a linhagem G. Na linhagem G, a árvore de BI mostrou *Cichlidogyrus longicirrus* inserido em uma politomia contendo os clados *Cichlidogyrus cubitus* + *Cichlidogyrus ergensi* + *Cichlidogyrus pouyaudi* e *Cichlidogyrus falcifer* + *Cichlidogyrus njinei*. Nessa mesma politomia, também surgiu um clado com resoluções fortemente suportadas pela PP, embora algumas incongruentes com a árvore de ML, o qual continha as espécies de *Scutogyrus* proximamente relacionadas surgindo como grupo irmão das demais espécies de *Cichlidogyrus*.

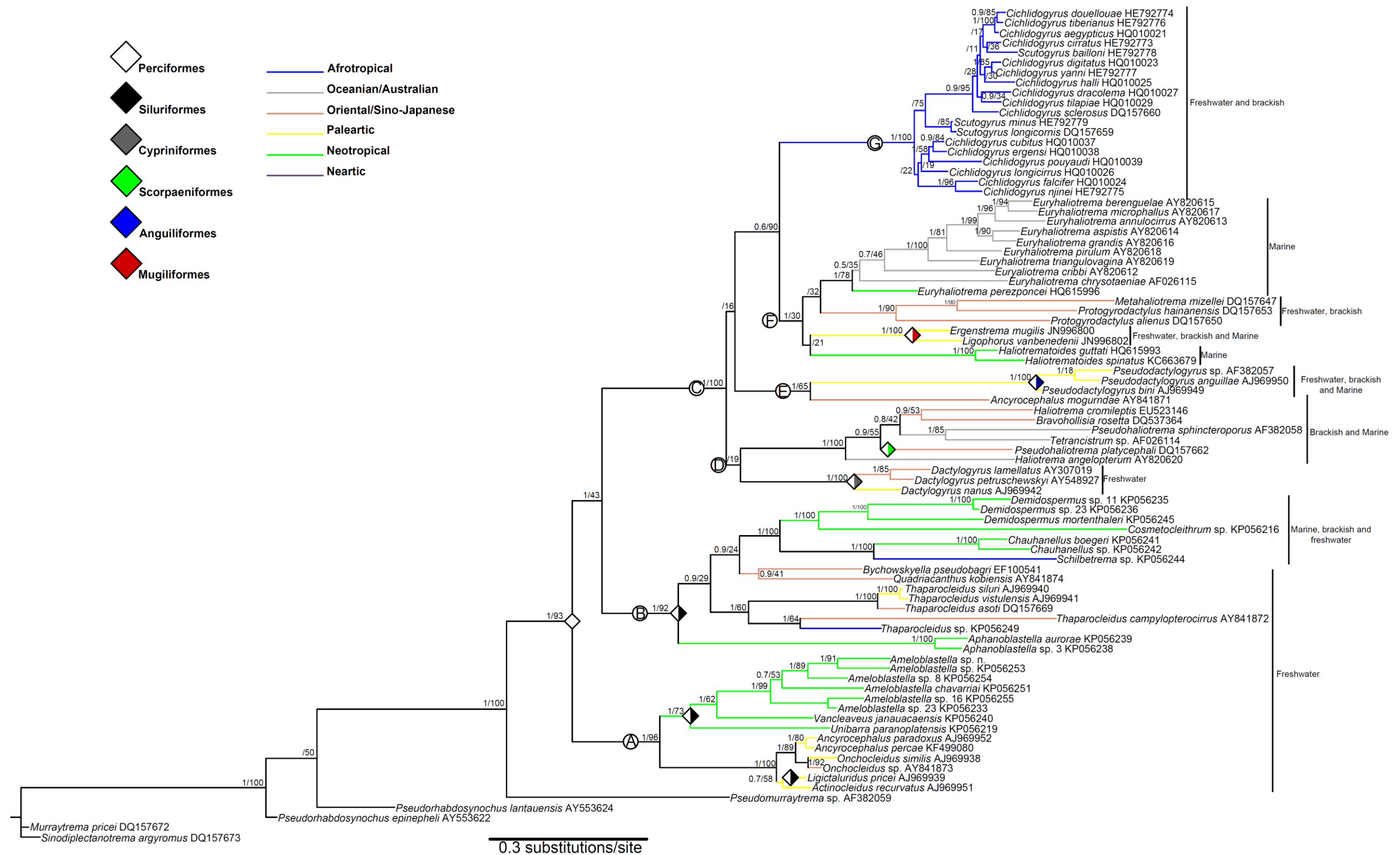


Figura 13 Reconstrução filogenética de *Ameloblastella* sp. n. baseada no gene 28S rDNA. Árvore gerada por meio de Máxima Verossimilhança (ML). Os nós são suportados por Probabilidade Posterior da Inferência Bayesiana e por 1000 réplicas de *Bootstrap* da ML. O caráter “ordem de hospedeiros” (Perciformes, Siluriformes, Cypriniformes, Scorpaeniformes, Anguiliformes e Mugiliformes) foi manualmente otimizado.

7.4. DISCUSSÃO

O presente estudo, baseado em análises morfológicas e no sequenciamento parcial do gene 28S rDNA, propõe uma nova espécie de *Ameloblastella*, bem como registra nova localidade e novo hospedeiro para espécimes deste gênero de monogenóideos. As inferências filogenéticas aqui conduzidas atestaram que *Ameloblastella* é um gênero monofilético e que Ancyrocephalinae não é um agrupamento natural corroborando resultados prévios (Bychowsky, 1961; Kritsky e Boeger, 1989; Šimková *et al.*, 2003; Plaisance *et al.*, 2005; Šimková *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Dang *et al.*, 2010; Mendlová *et al.*, 2010; Blasco-Costa *et al.*, 2012; Mendoza-Palmero *et al.*, 2015). As topologias propostas pela maioria das inferências filogenéticas baseadas em dados moleculares, mostraram a formação de um clado de espécies de Ancyrocephalinae de água doce, o qual aparece como grupo irmão de um clado de ancilodiscoidíneos e de um agrupamento com relações não resolvidas entre pseudodactilogiríneos, dactilogiríneos e ancirocefalíneos marinhos. Dentre esses estudos, a inferência feita por Mendoza-Palmero *et al.* (2015) é a que mais se aproxima da topologia recuperada no presente estudo.

A hipótese filogenética apresentada por Mendoza-Palmero *et al.* (2015) sugere que dactilogirídeos colonizaram hospedeiros siluriformes mais do que uma vez em sua história evolutiva. Essa hipótese também faz parte da proposta elaborada no presente estudo (Figura 13), a qual sugere a ocorrência de três eventos independentes de colonização desses hospedeiros. Em dois deles, dactilogirídeos da linhagem A colonizaram independentemente os siluriformes da região Paleártica e Neotropical. Na linhagem B, composta por ancirocefalíneos de ambientes de água doce da região Neotropical e ancilodiscoidíneos marinhos e de água doce das regiões Paleártica, Sino-Japonesa e Afrotropical, a colonização de hospedeiros siluriformes parece ser uma característica plesiomórfica, sugerindo a existência de uma linhagem de dactilogirídeos parasitas de bagres, como apontado anteriormente (Gusev, 1961; Lim *et al.*, 2001; Mendoza-Palmero *et al.*, 2015).

A maioria das inferências filogenéticas baseadas em análises moleculares, embora careçam de forte suporte de ramos, sugerem que Dactylogyridae é grupo irmão de Pseudodactylogyridae + três linhagens de ancirocefalíneos marinhos. Šimková *et al.* (2006), Mendlova *et al.* (2010) e Blasco-Costa *et al.* (2012) revelaram esse padrão de organização sistemática usando os marcadores 18S e 28S e, em algumas dessas propostas, espécies de água doce, membros de *Cichlidogyrus*, *Enterogyrus*, *Onchobdella* e *Scutogyrus* surgiram proximamente relacionadas às três linhagens de

ancirocefalíneos marinhos. Contudo, na árvore em que Šimková *et al.* (2003) enraizaram com *Girardia tigrina* e *Fasciola gigantica*, é proposto que pseudodactilogiríneos são um grupo irmão de Dactylogyrinae + ancirocefalíneos marinhos. Mendoza-Palmero *et al.* (2015) propuseram uma linhagem com dois principais clados envolvendo esses organismos. Em um deles surge Dactylogyrinae como grupo irmão de Pseudodactylogyrinae + *A. morgurndae* e no outro, as três linhagens de ancirocefalíneos marinhos, sendo uma dessas, proximamente relacionada as espécies de ancirocefalíneos de água doce, membros de *Cichlidogyrus* e *Scutogyrus* parasitas de perciformes afrotropicais (Figura 2). A linhagem C da presente proposta (Figura 13) é bastante similar a essa linhagem recuperada por Mendoza-Palmero *et al.* (2015). Entretanto, algumas relações dentro da linhagem C diferem da proposta de Mendoza-Palmero *et al.* (2015), estando mais próxima das propostas que sugeriram Dactylogyrinae como grupo irmão de Pseudodactylogyrinae + ancirocefalíneos marinhos + ancirocefalíneos parasitas de perciformes afrotropicais.

Os resultados obtidos aqui sugerem que Dactylogyrinae é grupo irmão de uma linhagem de ancirocefalíneos marinhos (Linhagem D), que é irmã da linhagem E, composta por pseudodactilogiríneos + *A. morgurndae* e que ambas são irmãs dos ancirocefalíneos marinhos (Linhagem F) + ancirocefalíneos parasitas de perciformes da região Afrotropical (Linhagem G). Os resultados obtidos aqui não solucionam a falta de consenso para as relações entre Dactylogyrinae, Pseudodactylogyrinae e ancirocefalíneos marinhos, principalmente devido a falta de robustez nos suportes que sustentam as hipóteses para esses grupos. Entretanto a relação de Dactylogyrinae, Pseudodactylogyrinae e ancirocefalíneos parasitas de perciformes de água doce da região Afrotropical parece estar intimamente relacionada com os ancirocefalíneos marinhos. Como foi sugerido previamente (Mendlová *et al.*, 2012), ancirocefalíneos parasitas de perciformes afrotropicais podem ser o resultado de processos evolutivos desencadeados por dispersões secundárias do ambiente marinho para ambientes de água doce. Isso é corroborado pelo fato de seus hospedeiros perciformes serem reconhecidos pela capacidade de invasão de ambientes de água doce. Processos evolutivos semelhantes podem ter ocorrido para pseudodactilogiríneos, cujos hospedeiros são anguiliformes tolerantes a ambientes com salinidade variável, para os dactilogiríneos e até mesmo para *Demidospermus* e *Cosmetocleithrum*, que são proximamente relacionados aos marinhos *Chauhanellus* spp.

7.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLASCO-COSTA, I.; MIGUEZ-LOZANO, R.; SARABEEV, V.; BALBUENA, J. A. Molecular phylogeny of species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) and their affinities within the Dactylogyridae. **Parasitology International**, v. 61, n. 4, p. 619-27, Dec 2012. ISSN 1873-0329 (Electronic) 1383-5769 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22742900> >.

BYCHOWSKY, B. E. Monogenetic trematodes: their systematics and phylogeny. **American Institute of Biological Sciences**, 1961.

DANG, B. T.; LEVSEN, A.; SCHANDER, C.; BRISTOW, G. A. Some *Haliotrema* (Monogenea: Dactylogyridae) from cultured grouper (*Epinephelus* spp.) with emphasis on the phylogenetic position of *Haliotrema cromileptis*. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 30-39, Feb 2010. ISSN 1937-2345 (Electronic) 0022-3395 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19697969> >.

FRANÇA, J. G.; ISAAC, A.; PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M. Dactylogyridae (Monogenea) from the gills of *Iheringichthys labrosus* (Osteichthyes: Pimelodidae) from the upper Paraná River floodplain, Brazil, with the proposal of *Pseudovancleaveus* ng. **Systematic Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 25-31, 2003. ISSN 0165-5752.

GEER, L. Y.; MARCHLER-BAUER, A.; GEER, R. C.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; LIU, C.; SHI, W.; BRYANT, S. H. The NCBI biosystems database. **Nucleic Acids Research**, p. gkp858, 2009. ISSN 0305-1048.

GUSEV, A. V. New subfamily of monogeneans (Monogenoidea). **Doklady Akademii Nauk**, v. 139, p. 1480–1482, 1961.

KRITSKY, D. C.; BOEGER, W. A. The phylogenetic status of the Ancyrocephalidae Bychowsky, 1937 (Monogenea, Dactylogyroidea). **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 207–211, 1989.

KRITSKY, D. C.; MENDOZA-FRANCO, E.; SCHOLZ, T. Neotropical Monogenoidea. 36. Dactylogyrids from the gills of *Rhamdia guatemalensis* (Siluriformes: Pimelodidae) from cenotes of the Yucatan Peninsula, Mexico, with proposal of *Ameloblastella* gen. n. and *Aphanoblastella* gen. n. (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae). **Comparative Parasitology**, v. 67, n. 1, p. 76–84, 2000.

KRITSKY, D. C.; THATCHER, V. E. New monogenetic trematodes from freshwater fishes of Western Colombia, with the proposal of *Anacanthoroides* gen. n. (Dactylogyridae). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 43, n. 2, p. 129–134, 1976.

LIM, L.; TIMOFEEVA, T.; GIBSON, D. Dactylogyridean monogeneans of the siluriform fishes of the Old World. **Systematic Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 159–197, 2001. ISSN 0165-5752.

MENDLOVÁ, M.; DESDEVISES, Y.; CIVÁŇOVÁ, K.; PARISELLE, A.; ŠIMKOVÁ, A. Monogeneans of West African cichlid fish: evolution and cophylogenetic interactions. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37268, 2012. ISSN 1932-6203.

MENDLOVA, M.; PARISELLE, A.; VYSKOCILOVA, M.; SIMKOVA, A. Molecular phylogeny of monogeneans parasitizing African freshwater Cichlidae inferred from LSU rDNA sequences. **Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1405–13, Nov 2010. ISSN 1432-1955 (Electronic) 0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697913> >.

MENDLOVÁ, M.; PARISELLE, A.; VYSKOCILOVA, M.; ŠIMKOVÁ, A. Molecular phylogeny of monogeneans parasitizing African freshwater Cichlidae inferred from LSU rDNA sequences. **Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1405–13, Nov 2010. ISSN 1432-1955 (Electronic) 0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697913> >.

MENDOZA-FRANCO, E. F.; MENDOZA-PALMERO, C. A.; SCHOLZ, T. New species of *Ameloblastella* Kritsky, Mendoza-Franco & Scholz, 2000 and *Cosmetocleithrum* Kritsky, Thatcher

& Boeger, 1986 (Monogenea: Dactylogyridae) infecting the gills of catfishes (Siluriformes) from the Peruvian Amazonia. **Systematic Parasitology**, v. 93, n. 9, p. 847-862, 2016. ISSN 0165-5752.

MENDOZA-FRANCO, E. F.; SCHOLZ, T. New dactylogyrids (Monogenea) parasitizing the gills of catfishes (Siluriformes) from the Amazon River basin in Peru. **Journal of Parasitology** v. 95, n. 4, p. 865–870, Aug 2009. ISSN 1937-2345 (Electronic) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19215149> >.

MENDOZA-PALMERO, C. A.; BLASCO-COSTA, I.; SCHOLZ, T. Molecular phylogeny of Neotropical monogeneans (Platyhelminthes: Monogenea) from catfishes (Siluriformes). **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 164, p. 1–11, 2015. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25890068> >.

MONTEIRO, C. M.; KRITSKY, D. C.; BRASIL-SATO, M. C. Neotropical monogenoidea. 55. Dactylogyrids parasitising the pintado-amarelo *Pimelodus maculatus* Lacepede (Actinopterygii: Pimelodidae) from the Rio Sao Francisco, Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 179–190, Jul 2010. ISSN 1573-5192 (Electronic) 0165-5752 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532849> >.

PLAISANCE, L.; LITTLEWOOD, D. T. J.; OLSON, P. D.; MORAND, S. Molecular phylogeny of gill monogeneans (Platyhelminthes, Monogenea, Dactylogyridae) and colonization of Indo-West Pacific butterflyfish hosts (Perciformes, Chaetodontidae). **Zoologica Scripta**, v. 34, n. 4, p. 425–436, 2005. ISSN 0300-3256 1463-6409.

PRICE, E. The monogenetic trematodes of Latin America. **Livro jubilar do Professor Lauro Travassos. Editado para comemorar o 25 aniversario de suas actividades scientificas (1913-1938)**, p. 407-413., 1938.

ŠIMKOVÁ, A.; MATEJUSOVA, I.; CUNNINGHAM, C. O. A molecular phylogeny of the Dactylogyridae sensu Kritsky & Boeger (1989) (Monogenea) based on the D1-D3 domains of large

subunit rDNA. **Parasitology**, v. 133, n. Pt 1, p. 43–53, Jul 2006. ISSN 0031-1820 (Print) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16515727> >.

ŠIMKOVÁ, A.; PLAISANCE, L.; MATĚJUSOVÁ, I.; MORAND, S.; VERNEAU, O. Phylogenetic relationships of the Dactylogyridae Bychowsky, 1933 (Monogenea: Dactylogyridea): the need for the systematic revision of the Ancyrocephalinae Bychowsky, 1937. **Systematic Parasitology**, v. 54, p. 1–11, 2003.

SURIANO, D.; INCORVAIA, I. Ancyrocephalid [Monogenea] parasites from siluriform fishes from the Paranean-Platan ichthyogeographical province in Argentina. **Acta Parasitologica**, v. 40, n. 3, 1995. ISSN 1230-2821.

WU, X.-Y.; CHILTON, N.; ZHU, X.; XIE, M.; LI, A. Molecular and morphological evidence indicates that *Pseudorhabdosynochus lantauensis* (Monogenea: Diplectanidae) represents two species. **Parasitology**, v. 130, n. 06, p. 669–677, 2005. ISSN 1469-8161.

WU, X.-Y.; ZHU, X. Q.; XIE, M. Q.; LI, A. X. The radiation of *Haliotrema* (Monogenea: Dactylogyridae: Ancyrocephalinae): molecular evidence and explanation inferred from LSU rDNA sequences. **Parasitology**, v. 132, n. Pt 5, p. 659–668, May 2006. ISSN 0031-1820 (Print) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16398949> >.

8. CAPÍTULO 3. SISTEMÁTICA MOLECULAR BASEADA NO GENE 18S RDNA SUPORTA A PROPOSTA DE UM NOVO GÊNERO E UMA NOVA COMBINAÇÃO PARA DACTILOGIRÍDEOS (MONOGENOIDEA) PARASITAS DE SILURIFORMES NA AMÉRICA DO SUL

Formatado de acordo com normas da ABNT

RESUMO

Dactilogirídeos correspondem a um especioso grupo de Monogenoidea e podem causar importantes doenças em peixes. Esses organismos são abundantes em ambientes de água doce, onde provavelmente originaram. A história evolutiva desse grupo reserva grandes complexidades que exigem que as descrições e registros de espécies e propostas filogenéticas sejam adequadamente conduzidas. No presente estudo, um novo gênero é proposto para alocar um dactilogirídeo parasita de *Phractocephalus hemioliopterus* da bacia do rio Tapajós, o qual apresenta: 1) gônadas sobrepostas; 2) OCM enrolado em sentido anti-horário, lembrando um saca-rolhas e envolto em uma bolsa do OCM; 3) peça acessória reduzida e articulada com a base do órgão copulatório masculino por meio de ligamento copulatório; 4) vagina sinistra e marginal e 5) barra ventral com projeção anteromedial. Nesse estudo, também foi descrita uma nova espécie de *Demidospermus* e duas espécies anteriormente consideradas *incertae sedis*, são transferidas para o gênero *Demidospermus*, sob a combinação *Demidospermus amazonensis* n. comb. e *Demidospermus catus* n. comb. Todas as propostas adotadas no presente estudo foram suportadas por inferência filogenética realizada com base no sequenciamento do gene 18S rDNA, utilizando os critérios da inferência Bayesiana e da Máxima Verossimilhança. A realização dessas análises exigiu coletas de outros hospedeiros de outra localidade, como *Hoplias malabaricus* e *Pimelodus maculatus* da bacia hidrográfica do rio Paraná, afim de serem examinados para que espécies reconhecidas por infestarem esses hospedeiros fossem coletadas e adicionadas à inferência filogenética aqui conduzida. Os resultados aqui apresentados contribuem para elucidar as relações evolutivas dentro de Dactylogyridae, e para compreender que as diferentes linhagens da família aparentemente experienciaram diferentes processos de pressão seletiva que conduziram a inúmeros

eventos de colonização de hospedeiros siluriformes, bem como de colonização secundária de ambientes marinhos e de retorno aos ambientes de água doce.

8.1. INTRODUÇÃO

Dactilogirídeos representam a linhagem de Monogenoidea mais especiosa na região Neotropical (Mendoza-Franco *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 2013). Esses organismos são primariamente parasitas de peixes de água doce (Bychowsky, 1961) com alguns episódios de colonização secundária de peixes estuarinos e marinhos (Plaisance *et al.*, 2005; Mendoza-Franco *et al.*, 2009; Domingues *et al.*, 2016), e eventualmente, podem causar importantes doenças nesses hospedeiros (Buchmann e Bresciani, 2006; Whittington e Chisholm, 2008). Na região Neotropical há registros desses parasitas associados a peixes de 20 ordens, embora sua diversidade mais expressiva seja alcançada em peixes caracíformes (54%), siluriformes (24%) e percíformes (14%) (Mendoza-Franco *et al.*, 1999; Kritsky, Mendoza-Franco, *et al.*, 2009; Kritsky, Yang, *et al.*, 2009; Mendoza-Franco *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2013; Branches e Domingues, 2014; Karling *et al.*, 2014; Monteiro e Brasil-Sato, 2014; Narciso *et al.*, 2014; Neto *et al.*, 2015; Yamada *et al.*, 2015; Domingues *et al.*, 2016).

Os dactilogirídeos parasitas de siluriformes neotropicais têm recebido bastante atenção nos últimos anos, e têm sido reconhecidos como componentes de um interessante modelo para estudos co-evolutivos e biogeográficos (Kritsky *et al.*, 2000; Kritsky e Mendoza-Franco, 2003; Mendoza-Franco e Scholz, 2009; Cepeda e Luque, 2010; Monteiro *et al.*, 2010; Aguiar *et al.*, 2011; Mendoza-Palmero e Scholz, 2011; Mendoza-Palmero *et al.*, 2012; Mendoza-Palmero *et al.*, 2015). Entretanto, problemas relacionados à sistemática do grupo, que envolve sinonimizações (Kritsky e Gutiérrez, 1998; Cohen e Kohn, 2008), novas combinações (Mendoza-Palmero e Scholz, 2011), espécies ainda em *incertae sedis* (Kritsky *et al.*, 1986b) e evidências de ausência de monofilia para certos grupos (Mendoza-Palmero *et al.*, 2015), têm dificultado a elaboração de propostas epidemiológicas, biogeográficas e/ou co-evolutivas.

O presente estudo, por meio de inferência filogenética baseada no sequenciamento total do gene 18S rDNA e caracterização morfológica de dactilogirídeos parasitas de pimelodídeos das bacias dos rios Tapajós e Paraná, traz evidências que suportam a existência de novas linhagens

dentro desse grupo de dactilogirídeos. Os objetivos específicos foram, além de providenciar novas sequências do gene 18S para dactilogirídeos neotropicais, reconhecer as estruturas de diagnose de espécies anteriormente descritas, propor um novo gênero para alocar uma nova espécie, descrever uma nova espécie de *Demidospermus* Suriano, 1983, e propor uma nova combinação para *Urocleidoides catus* Mizelle e Kritsky, 1969 e *Urocleidoides amazonensis* Mizelle e Kritsky, 1969, todos parasitas das brânquias de *Phractocephalus hemiliopterus* (Bloch & Schneider, 1801).

8.2. MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Análises moleculares dos parasitas

As reações em cadeia de polimerase (PCRs) foram realizadas em três etapas. Em primeiro lugar, utilizando os *primers* DAC18F1 (5' - AATCAGCTATGGTTCCTTGGAT - 3') (desenhados para este estudo) e IR8 (5' - GCTAGCTGCGTTCTTCATCGA - 3') (Sinnappah *et al.*, 2001), que se anelam, respectivamente, nas posições 116 do 18S rDNA e na posição 2440 do ITS1. Posteriormente foram realizadas duas *Nested* PCR, sendo uma para os primeiros ~1000 pares de base (pb) do 18S rDNA (18SA), para a qual foram utilizados os *primers* DAC18F1 e DAC18R1 (5' - TTTATGGTCAGAACTAGGACGGT - 3') (desenhado para este estudo) e outra, para os demais ~1000 pb (18SB), na qual utilizaram-se os *primers* 930F (5' - GCATGGAATAATGGAATAGG - 3') (Littlewood *et al.*, 2008) e wormB (5' - CTTGTTACGACTTTTACTTCC - 3') (Littlewood e Olson, 2001). Utilizou-se uma quantidade de 0,2 mM de cada *primer* e 4 µl de DNA extraído nas reações de PCR iniciais, com desnaturação inicial a 94° C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94° C durante 30 s, 58° C durante 30 s, 72° C durante 90s, e alongamento final a 72° C durante 10 min. As *Nested* PCR foram conduzidos com 1 µl do produto dos PCRs, diluídos a 1:1 em água ultrapura. Para a amplificação de 18SA, iniciou-se o processo com desnaturação a 94° C durante 3 min, seguidos de 35 ciclos de 94° C durante 30 s, 54° C durante 45 s, 72° C durante 60s, e depois alongamento final a 72° C durante 7 min. Para amplificar o 18SB, configurou-se uma desnaturação inicial de 94° C durante 3 min, seguidos de 35 ciclos de 94° C durante 30 s, 58° C durante 30 s, 72° C durante 60s, e depois alongamento final a 72° C durante 7 min. Para o sequenciamento também foram utilizados os

primers 300F (5' - AGGGTTCGATTCCGGAG - 3') (Littlewood *et al.*, 2008) para 18SA e 1200R (5' - GGGCATCACAGACTTG - 3') (Littlewood e Olson, 2001) para 18SB.

8.2.2 Inferência filogenética

As inferências filogenéticas foram realizadas por meio de uma matriz elaborada com 66 sequências de 18S rDNA de polioncoineos mais duas de polistomatídeos (Heteronchoinea), baixadas do banco de dados NCBI (Geer *et al.*, 2009). O alinhamento destas sequências mais 16 novas sequências de dactilogirídeos neotropicais providenciadas no presente estudo foi submetido a geração de um bloco de genes, com configuração menos rigorosa (Talavera e Castresana, 2007). Árvores filogenéticas foram geradas a partir dos alinhamentos de sequência usando Inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML).

Duas cadeias independentes de Markov Monte Carlo (MCMC) foram corridas para 300.000 gerações em 3 cadeias de 100.000. A amostragem das árvores foi configurada para cada 100ª geração e o diagnóstico para cada 1000ª, sendo as primeiras 25% das amostras descartadas. A ML foi configurada conforme descrito na metodologia geral. Duas sequências de polistomatídeos, *Diplorchis ranae* Ozaki, 1931 e *Concinnocotyla australiensis* (Richenbach-Klinke, 1966), foram usadas como grupos externos.

8.3. RESULTADOS

8.3.1. Taxonomia morfológica

Sumário Taxonômico

Classe: Monogenoidea Bychowsky, 1937

Subclasse: Polyonchoinea Bychowsky, 1937

Ordem: Dactylogyridea Bychowsky, 1937

Família Dactylogyridae Bychowsky, 1933

Gênero: *Demidospermus* Suriano, 1983

Espécie: *Demidospermus amazonensis* (Mizelle & Kritsky, 1969) n. comb. Figuras 14 e 15

Hospedeiro tipo: *Phractocephalus hemioliopterus* (Bloch & Schneider, 1801) (Bloch & Schneider, 1801) (Siluriformes, Pimelodidae).

Localidade tipo: Bacia do Rio Amazonas.

Sítio de infestação: Brânquias.

Presente registro: *Phractocephalus hemioliopterus*, Rio Tapajós (Bacia Amazônica – sub-bacia dos rios Amazonas, Tapajós, Juruena), Itaituba (04° 33' 10" S, 56° 17' 60" O), Santarém (02° 20' 13" S, 54° 52' 53" O); Igarapé Jari, Comunidade Jari do Socorro, Santarém (2° 20' 24" S, 54° 53' 59" O), Pará, Brasil.

Medidas (baseada em 5 espécimes: 1 montado em Hoyer + GAP, 3 montados em Hoyer e 1 montado em meio de Grey & Wess): Corpo 518 (371,5 – 606) de comprimento; largura máxima 156,5 (139 – 175,5). Faringe 36 (31,5 – 43; n = 3) de diâmetro. Haptor 57 (51 – 61,5) de comprimento, 74 (68,5 – 83) de largura. Âncora ventral 31 (29,5 – 34,5) de comprimento, 18,5 (16 – 21,5) de largura da base; âncora dorsal 30 (28,5 – 31,5) de comprimento, 19 (17,5 – 20) de largura da base. Barra ventral 38,5 (33,5 – 44,5) de comprimento, distância entre extremidades 36 (28,5 – 43); barra dorsal 44 (35 – 49,5) de comprimento. Gancho par 1: 17 (15,5 – 19; n = 8) de comprimento, par 2 e 3: 14 (13,5 – 15) de comprimento, par 4: 15 (14 – 16; n = 3) de comprimento, par 5: 21 (19 – 24; n = 3), par 6: 25 (23,5 – 26,5; n = 2). Órgão copulatório masculino (OCM) 111,5 (85 – 138; n = 2) de comprimento, diâmetro do primeiro anel do OCM 17 (13 – 21; n = 2) de comprimento; peça acessória 39,5 (29 – 50; n = 2). Testículo 88 (73,5 – 111; n = 4) de comprimento, 66 (88 – 65,5; n = 4) de largura. Germário 91 (82 – 107; n = 4) de comprimento, 53,5 (38,5 – 66; n = 4) de largura.

Comentários: Espécies de *Urocleidoides* Mizelle & Price, 1964 e *Demidospermus* compartilham alguns caracteres que as tornam morfologicamente semelhantes. Por exemplo, o OCM das espécies que compõem *Urocleidoides* possui a forma enrolada em sentido anti-horário, com uma peça acessória em forma de bainha envolvendo-o, semelhante ao de algumas espécies de *Demidospermus* (Mizelle e Price, 1964; Suriano, 1983; Kritsky *et al.*, 1986b; Rosim *et al.*, 2011).

As espécies de *Urocleidoides* ainda possuem gônadas enfileiradas, barras haptorais ligeiramente retas ou em forma de U e V, e abertura vaginal sinistral, que também são características presentes nas espécies de *Demidospermus*. Entretanto, espécies de *Urocleidoides* distinguem-se das espécies de outros gêneros, inclusive das espécies de *Demidospermus*, principalmente por compartilharem uma sinapomorfia, um esclerito em forma de gancho associado a vagina. Ao realizarem uma revisão de *Urocleidoides*, por não observarem a presença do esclerito vaginal, Kritsky *et al.* (1986b) consideraram 22 espécies do gênero como *incertae sedis*, entre elas algumas que parasitam peixes siluriformes.

Entre as espécies de *Urocleidoides* parasitas de siluriformes consideradas *incertae sedis*, *Urocleidoides* (= *Ameloblastella*) *chavarriai* (Price, 1938), *Urocleidoides* (= *Ameloblastella*) *mamaevi* (Kritsky e Thatcher, 1976), *Urocleidoides* (= *Aphanoblastella*) *travassosi* (Price, 1938), *Urocleidoides* (= *Aphanoblastella*) *mastigatus* (Suriano, 1986), *Urocleidoides* (= *Aphanoblastella*) *robustus* (Mizelle e Kritsky, 1969), *Urocleidoides* (= *Demidospermus*) *lebedevi* Kritsky e Thatcher, 1976, *Urocleidoides* (= *Philocorydoras*) *corydori* (Molnar, Hanek e Fernando, 1974) e *Urocleidoides* (= *Philocorydoras*) *margolisi* (Molnar, Hanek e Fernando, 1974), foram re combinadas em outros gêneros com base na similaridade morfológica (Kritsky *et al.*, 2000; Mendoza-Palmero e Scholz, 2011; Yamada *et al.*, 2015). Contudo, outras espécies como *Urocleidoides carapus* Mizelle, Kritsky e Crane, 1968, *Urocleidoides gymnotus* Mizelle, Kritsky e Crane, 1968, *D. amazonensis* n. comb., *U. catus* e *Urocleidoides megorchis* Mizelle e Kritsky, 1969, carecem ainda de propostas de novas combinações que evidenciem a história natural desses grupos.

As principais características que observamos nos espécimes de *D. amazonensis* n. comb. e que corroboram com a descrição original (Mizelle e Kritsky, 1969) são: presença de 4 olhos; âncoras morfológicamente similares, ventral ligeiramente maior; barras semelhantes, sendo a barra ventral maior que a barra dorsal (Figuras 14 e 15). Mizelle e Kritsky (1969) observaram espécimes contendo gônadas sobrepostas ou enfileiradas, porém no presente estudo foram observados apenas espécimes com gônadas enfileiradas. O OCM de acordo com Mizelle e Kritsky (1969), possui um ou dois anéis com ornamento na parte terminal, porém o anel distal pode se assemelhar a uma torção (Figuras 14 e 15). A peça acessória com porção distal sigmoidal (Mizelle e Kritsky, 1969) foi vista nos espécimes do presente estudo como deltoide e com porção distal sinuosa. Embora os autores não tenham observado vagina nos espécimes de *D. amazonensis* n. comb., nós a vimos, não

esclerotizada se abrindo na região sinistra do corpo. Apesar das diferenças notadas, os espécimes examinados no presente estudo possuem barras e âncoras idênticas as de *D. amazonensis* n. comb., e em muitos espécimes do presente estudo, os quais apresentaram OCM menos distendidos, foi possível dignosticar a morfologia de OCM descrita pelos autores na descrição original. Considerando que *D. amazonensis* n. comb. compartilha caracteres morfológicos (morfologia do OCM e estruturas haptorais, posição da abertura vaginal e das gônadas) com espécimes de *Demidospermus* e que a proposta filogenética apresentada no presente estudo (Figura 24) sugere que esses caracteres podem ser homólogos, propõe-se no presente estudo a transferência de *D. amazonensis* n. comb. para *Demidospermus* com a combinação *D. amazonensis* n. comb.

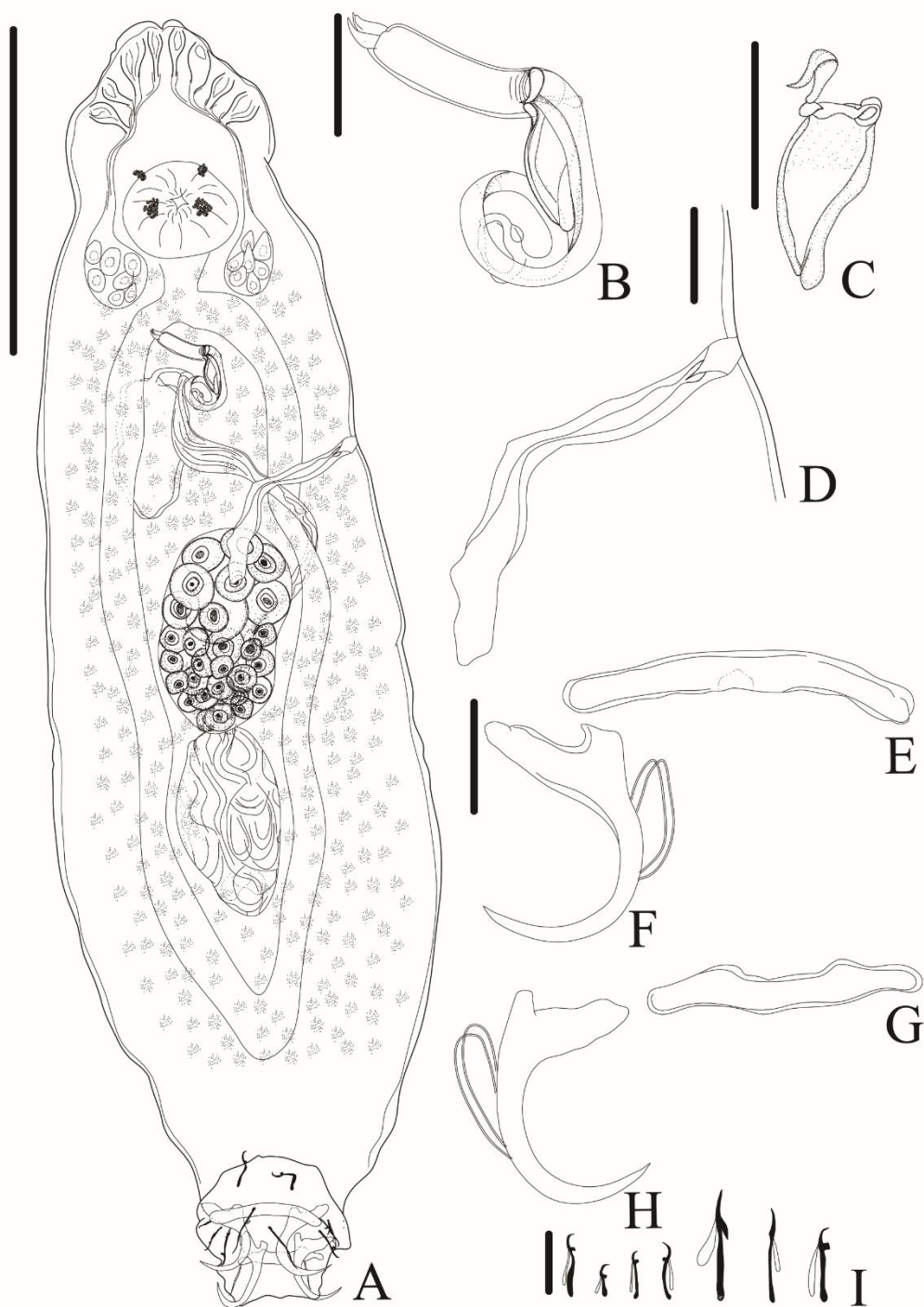


Figura 14 *Demidospermus amazonensis* n. comb. parasita de *Phractocephalus hemiliopterus*, proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil. **A** - desenho composto do helminto inteiro, **B** - órgão copulatório masculino, **C** - peça acessória, **D** - vagina, **E** - barra ventral, **F** - âncora ventral, **G** -

barra dorsal, **H** - âncora dorsal, **I** - ganchos pares de 1-7. Barra de escala = 100 μm (A), 15 μm (B – C, E – H), 10 μm (D, I).

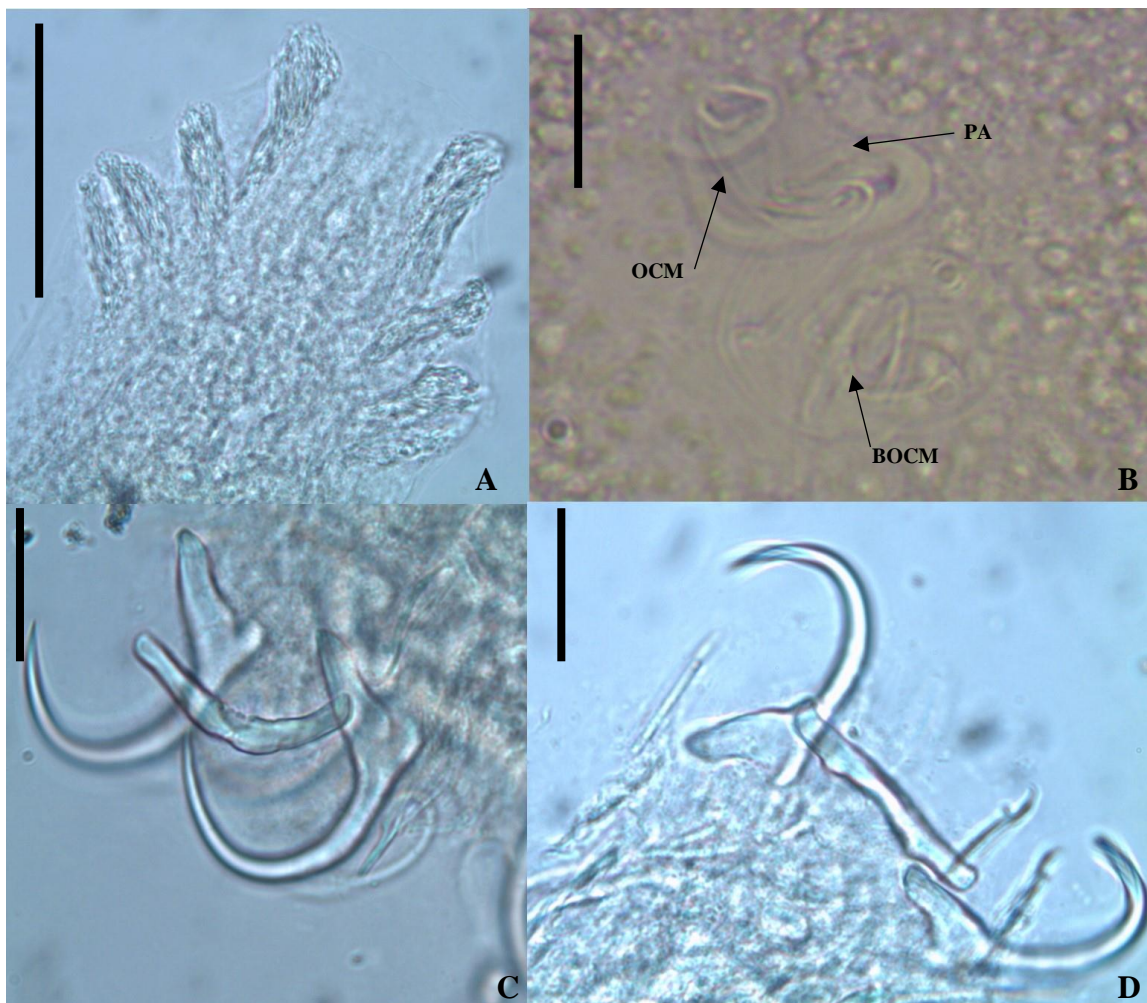


Figura 15 *Demidospermus amazonensis* n. comb. parasita de *Phractocephalus hemiliopterus* proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil. **A** - região anterior da cabeça exibindo quatro pares de órgãos da cabeça, **B** - complexo copulatório, órgão copulatório masculino (OCM), base do OCM (BOCM), peça acessória (PA), **C** - barra e âncoras ventrais barra dorsal, **D** - barra e âncoras dorsais. Barra de escala = 50 μm (A), 20 μm (C–D), 10 μm (B).

Espécie: *Demidospermus catus* (Mizelle & Kritsky, 1969) n. comb. Figuras 16 e 17

Hospedeiro tipo: *Phractocephalus hemioliopterus* (Bloch & Schneider, 1801) (Bloch & Schneider, 1801) (Siluriformes, Pimelodidae).

Localidade tipo: Bacia do Rio Amazonas.

Sítio de infestação: Brânquias.

Presente registro: *Phractocephalus hemioliopterus*, Rio Tapajós (Bacia Amazônica – sub-bacia dos rios Amazonas, Tapajós, Juruena), Itaituba (04° 33' 10" S, 56° 17' 60" O), Santarém (02° 20' 13" S, 54° 52' 53" O); Igarapé Jari, Comunidade Jari do Socorro, Santarém (2° 20' 24" S, 54° 53' 59" O), Pará, Brasil.

Medidas (baseada em 25 espécimes: 15 corados com Tricrômico de Gomori e montados em balsamo do Canadá, 5 montados em meio de Grey & Wess, 1 montado em Gray & Wess + GAP, 2 montados em meio Hoyer e 2 montados em meio Hoyer + GAP). Corpo 318 (239 – 431) de comprimento; largura máxima 85 (48 – 136), ao nível médio do corpo. Faringe 20 (11 – 26; n = 19) de diâmetro. Haptor 48 (29 – 70; n = 25) de comprimento, 66 (47 – 92; n = 25) de largura. Âncora ventral 32 (27 – 38; n = 25) de comprimento, 16 (14 – 20; n = 22) de largura da base; âncora dorsal 26 (18 – 32; n = 23) de comprimento, 14 (12 – 18; n = 17) de largura da base. Barra ventral 39 (31 – 52; n = 24) de comprimento, distância entre extremidades 36 (29 – 43; n = 11); barra dorsal 36 (31 – 47; n = 23) de comprimento. Gancho pares 1 e 7, 17 (13 – 20; n = 29) de comprimento; par 2, 16 (13 – 20; n = 14) de comprimento; pares 3 e 4, 15 (12 – 17; n = 24) de comprimento; par 5, 25 (18 – 29; n = 13); par 6, 24 (15 – 26; n = 10). Órgão copulatório masculino (OCM) 132 (102 – 160; n = 24) de comprimento; diâmetro do primeiro anel do OCM 12 (8 – 17; n = 23); peça acessória 29 (17 – 42; n = 21) de comprimento. Testículo 53 (34 – 71; n = 22) de comprimento, 31 (16 – 59; n = 22) de largura. Germário 50 (33 – 74; n = 22) de comprimento, 27 (12 – 43; n = 22). Ovo 59 x 81 (78 – 87 x 43 – 70; n = 4).

Comentários: De acordo com Mizelle e Kritsky (1969), a espécie morfologicamente mais próxima de *D. amazonensis* n. comb. é *D. catus* n. comb.. Na descrição feita pelos autores, pode-se observar que *D. amazonensis* n. comb. apresenta um OCM diferente de *D. catus* n. comb., embora ambos sejam enrolados em sentido anti-horário. Ambas as espécies foram descritas a partir de espécimes recuperados de *P. hemioliopterus*, na bacia do rio Amazonas, Amazonas, Brasil. A morfologia dos espécimes de *D. catus* n. comb. que encontramos, corrobora as observações feitas por Mizelle e Kritsky (1969). As suas principais características são: a presença de 4 olhos; âncoras

similares; barra ventral com margem irregular, ligeiramente curvada no meio; barra dorsal frequentemente com entalhe anterior mediano (Figuras 16 e 17). De acordo com os autores, as gônadas de *D. catus* n. comb. podem ser enfileiradas ou sobrepostas, porém os espécimes observados no presente estudo apresentaram exclusivamente gônadas enfileiradas (Figura 16). Mizelle e Kritsky (1969) observaram que o OCM de *D. catus* n. comb. possui de dois a três anéis, com prolongação em forma de nadadeira na região distal e contém uma peça acessória simples, o que também foi observado nos espécimes do presente estudo, porém a precisa morfologia e origem das prolongações observadas na região distal do OCM são difíceis de determinar, embora se assemelhem a farpas (Figuras 16 e 17). Segundo Mizelle e Kritsky (1969) a vagina é ventral, alongada, associada a um tubo, contudo observamos a vagina não esclerotizada e com abertura sinistral (Figura 16). Podemos confirmar que tanto *D. amazonensis* n. comb. quanto *D. catus* n. comb. não apresentam o esclerito vaginal, sinapomorfia de espécies de *Urocleidoides* (Mizelle e Price, 1964; Kritsky *et al.*, 1986b). Considerando que os espécimes de *D. catus* n. comb. compartilham os mesmos caracteres que *D. amazonensis* n. comb. compartilha com espécimes de *Demidospermus* e que a proposta filogenética apresentada (Figura 24), sugere uma relação próxima entre essas espécies, no presente estudo propõe-se uma nova combinação transferindo essa espécie para *Demidospermus* como *D. catus* n. comb.

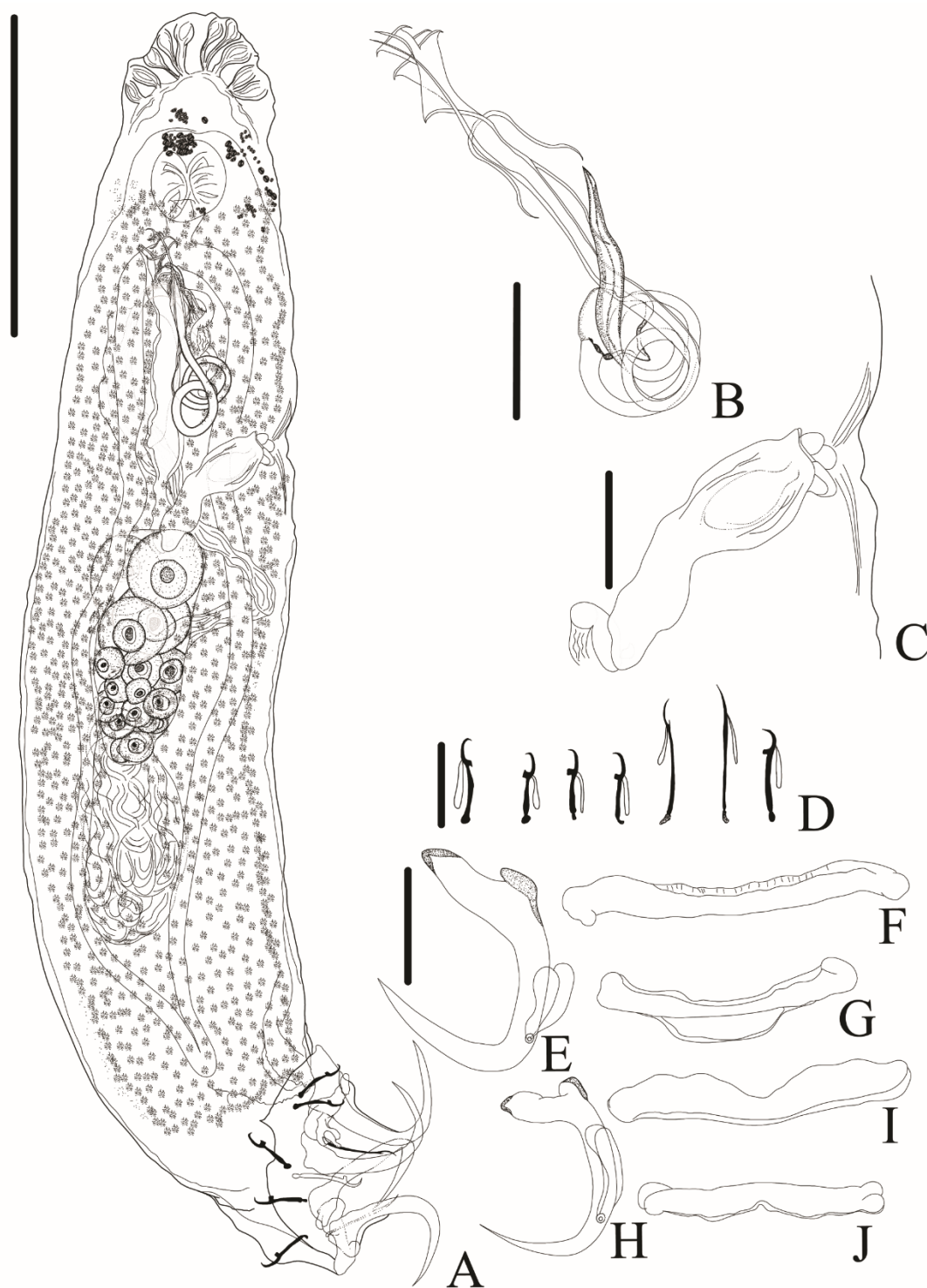


Figura 16 *Demidospermus catus* n. comb. parasita de *Phractocephalus hemioliopus*, proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil. **A** - desenho composto do helminto inteiro, **B** - órgão

copulatório masculino, **C** - vagina, **D** - ganchos pares de 1-7, **E** - âncora ventral, **F-G** - barra ventral, **H** - âncora dorsal, **I e J** - barra dorsal. Barra de escala = 100 μm (A), 15 μm (B-J)

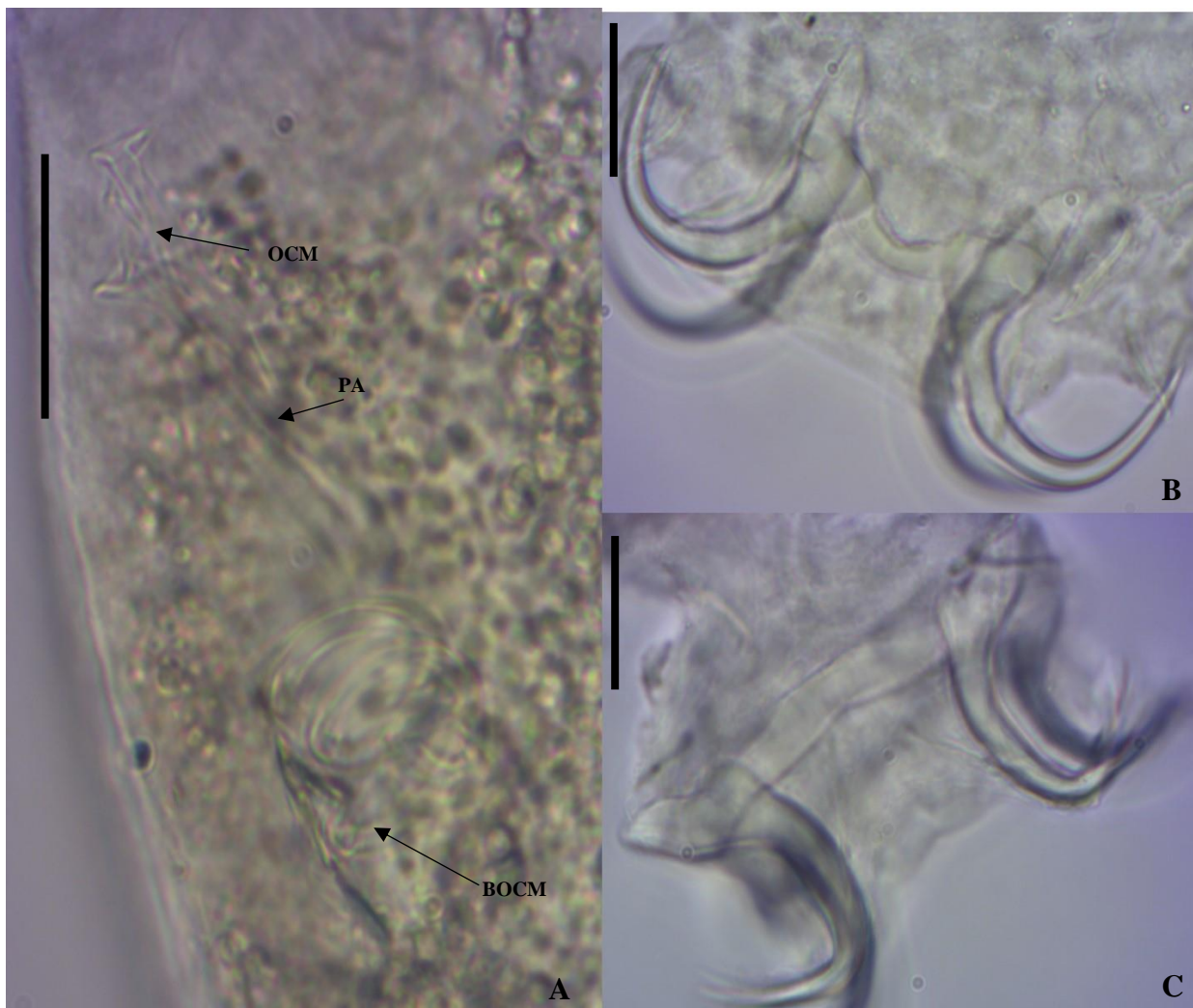


Figura 17 *Demidospermus catus* n. comb. parasita de *Phractocephalus hemioliopus* proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil. **A** - complexo copulatório, órgão copulatório masculino (COM), base do OCM (BOCM), peça acessória (PA), **B** - barra e âncoras ventrais, **C** - barra e âncoras dorsais. Barra de Escala = 25 μm (A), 15 μm (B, C).

Espécie: *Demidospermus* sp. n. Figuras 18 e 19

Hospedeiro tipo: *Phractocephalus hemioliopus* (Bloch & Schneider, 1801) (Siluriformes, Pimelodidae).

Localidade tipo: Igarapé Jari, Rio Tapajós (Bacia Amazônica – subbacia dos rios Amazonas, Tapajós e Juruena), Santarém, Pará, Brasil (2° 20' 24" S – 54° 53' 59" O).

Localidade adicional: Parque Nacional da Amazônia, Rio Tapajós, Itaituba, Pará, Brasil (04° 33' 10 S" – 56° 17' 60" O).

Sítio de infestação: Brânquias.

Descrição (baseada em 15 espécimes: 6 corados com Tricrômico de Gomori e montados em balsamo do Canadá e 9 montados em meio de Grey & Wess): Corpo 443 (322 – 707; n = 15) de comprimento, fusiforme; largura máxima 118 (75 – 163; n = 14), geralmente ao nível do testículo, raramente entre germário e testículo. Região cefálica distinta do tronco, com um par de lobos cefálicos pouco desenvolvidos; cinco pares de órgãos da cabeça presentes, cada par se abrindo um conjunto de glândulas cefálicas posteriores à faringe. Dois pares de olhos equidistantes, posteriores maiores e acima da faringe; grânulos cefálicos ausentes. Faringe 28 (22 – 35; n = 12) de diâmetro; esôfago curto, bifurca-se em dois cecos intestinais, confluentes após o testículo, formando um prolongamento que invade parcialmente o pedúnculo. Pedúnculo moderadamente desenvolvido, conspicuo, com a parte dorsal destacada da parte ventral; haptor 71 (43 – 137; n = 13) de comprimento, 144 (60 – 252; n = 12) de largura, hexagonal e conspicuo. Âncora ventral 38 (21 – 44; n = 14) de comprimento, 22 (13 – 41; n = 14) de largura da base; âncora dorsal 41 (39 – 45; n = 12) de comprimento, 23 (20 – 26; n = 11) de largura da base, ambas com raiz superficial bem desenvolvida, raiz profunda pouco desenvolvida, lâmina curta e reta, e com ponta reta e alongada, ultrapassando a raiz superficial. Barra ventral 51 (41 – 64; n = 13) de comprimento, distância entre extremidades 44 (30 – 58; n = 12), ligeiramente reta, com um sulco médio anterior e um posterior, com extremidades contendo posteriormente uma proeminência arredondada e anteriormente uma proeminência aguda; barra dorsal 49 (35 – 64; n = 12) de comprimento, distância entre extremidades 43 (28 – 60; n = 11), reta, contendo nas extremidades uma proeminência arredondada posterior e uma proeminência aguda anterior. Ganchos desiguais, não dilatados, com filamentos do gancho; pares 1 e 2 robustos, com ponta delicada, lâmina curva no par 1 e reta no par 2, polegar reto, haste uniforme em espessura no par 1 e afunilando distalmente no par 2, com ligeira constrição proximal; par 3 delicado, com ponta inconspícua, lâmina curva, polegar reto, haste afunilando distalmente e proximalmente, extremidade proximal fracamente esclerotizada sucedida por ligeira constrição; par 4 robusto, com ponta delicada, lâmina curva, polegar ereto, haste espessada

distalmente, com constrição proximal; pares 5 e 6 delicados, ponta romba, lâmina reta, polegar deprimido, haste uniforme no par 5 e afunilando distalmente no par 6, com constrição proximal e extremidade fracamente esclerotizada no par 5; par 7 delicado, com ponta romba, polegar ereto, haste uniforme e extremidade proximal fracamente esclerotizada. Gancho pares 1 – 3: 14 (12 – 17; n = 19) de comprimento, pares 4 e 5: 16 (14 – 18; n = 11) de comprimento, par 6: 17 (14 – 18; n = 6) de comprimento, par 7: 15 (15 – 17; n = 6). Poro genital medioventral, abaixo do nível da bifurcação do ceco intestinal. Órgão copulatório masculino (OCM) 132 (103 – 160; n = 15) de comprimento, diâmetro do primeiro anel OCM 17 (9 – 21; n = 15); tubular, espessado, enrolado com um anel proximal e uma torção distal, ambos em sentido anti-horário, base fortemente esclerotizada, disforme, contendo até 3 projeções em forma de abas; peça acessória 35 (20 – 45; n = 15) de comprimento, esclerotizada, em forma de bainha, envolvendo a porção distal do OCM, não articulada à base do OCM. Reservatório prostático não observado. Gônadas enfileiradas, testículo posterior ao germário. Testículo oval, 53 (42 – 71; n = 8) de comprimento, 40 (25 – 54; n = 8) de largura; canal deferente surgindo da região médio-anterior do testículo, envolvendo dorso-ventralmente o ramo esquerdo do ceco intestinal, dilatando distalmente e formando a vesícula seminal. Vagina sinistra, com pré-átrio, átrio e canal vaginal não esclerotizado; esclerito vaginal fortemente esclerotizado, interno ao canal e átrio vaginal, em forma de garra, contendo cinco projeções lanciformes distais; canal vaginal com paredes proximais anterior e posterior espessada. Útero presente; oótipo e receptáculo seminal não observados. Germário oval, 57 (38 – 76; n = 9) de comprimento, 40 (28 – 60; n = 9) de largura. Ovo 93 (82 e 103) de comprimento, 42 (31 e 53) de largura, com filamento proximal robusto. Vitelária bem desenvolvida, coextensiva com ceco e ausente nas regiões das estruturas dos sistemas reprodutivos.

Comentários: *Demidospemus* sp. n. difere de todas as demais espécies do gênero, por apresentar um esclerito fortemente esclerotizado, internamente no canal vaginal e átrio vaginal (Figuras 18 e 19). No que se refere ao OCM, *Demidospemus* sp. n., assemelha-se a *D. amazonensis* n. comb., que também contém um anel proximal e uma torção na porção mais distal (Figuras 14, 18 e 19). Contudo, *Demidospemus* sp. n. se distingue ainda de *D. amazonensis* n. comb. pela morfologia dos ganchos do par 2, os quais são truncados e bem menores do que os demais pares de ganchos em *D. amazonensis* n. comb., enquanto não são truncados e são apenas ligeiramente menores que os pares 4, 5 e 6 em *Demidospermus* sp. n.; pela morfologia de barras haptorais, as quais apresentam extremidades com projeções anteriores e posteriores em *Demidospermus* sp. n.,

enquanto que as extremidades das barras de *D. amazonensis* n. comb. são arredondadas e sem projeções; e pela morfologia das âncoras, que apresentam raízes superficiais bem mais desenvolvidas do que as raízes profundas nas âncoras ventral e dorsal de *Demidospermus* sp. n., quando comparadas com as âncoras de *D. amazonensis* n. comb. as quais não apresentam raízes superficiais bem mais desenvolvidas do que as raízes profundas (Figuras 14, 18 e 19).

Em *Demidospermus* sp. n., a presença de raízes superficiais das âncoras haptorais bem mais desenvolvidas do que as raízes profundas lembra aquelas de *D. lebedevi*, *Demidospermus ceccarellii* Cepeda & Luque, 2010, *Demidospermus ichthyocercus* Monteiro, Kritsky & Brasil-Sato, 2010 e de *Demidospermus morthentaleri* Mendoza-Palmero, Scholz, Mendoza-Franco & Kuchta, 2012. No entanto, em *D. lebedevi*, apenas a âncora dorsal e, em *D. morthentaleri*, apenas a ventral apresenta essa característica. Nos casos de *D. ceccarellii* e *D. ichthyocercus*, embora as raízes superficiais bem mais desenvolvidas do que as raízes profundas estejam presentes em ambas as âncoras, a morfologia do OCM dessas espécies (tubular recurvado), difere drasticamente da morfologia do OCM de *Demidospermus* sp. n., o qual possui um anel proximal e uma troção distal (Figuras 18 e 19).

As características acima citadas, somadas ao fato de que *Demidospermus* sp. n. difere de todas as congêneras pela presença de um esclerito vaginal (Figuras 18 e 19) e ainda à proposta filogenética do presente estudo (Figura 24), suportam a presente proposta de uma nova espécie para gênero *Demidospermus*.

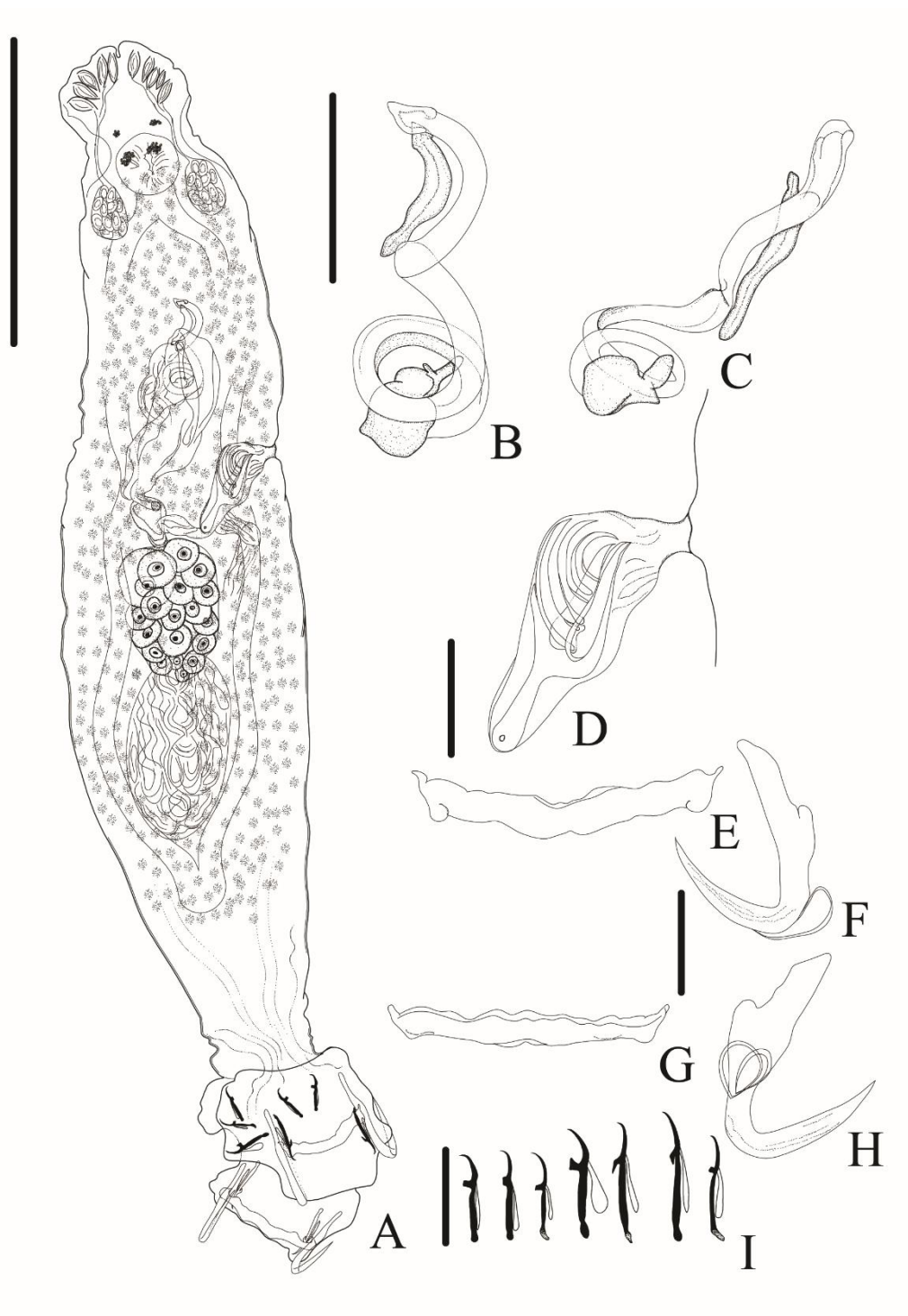


Figura 18 *Demidospermus* sp. n. parasita de *Phractocephalus hemioliopterus*, proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil. **A** - desenho composto do helminto inteiro, **B** e **C** - órgão copulatório masculino (vista ventral e dorsal), **D** - vagina, **E** - barra ventral, **F** - âncora ventral, **G** - barra dorsal,

H - âncora dorsal, **I** - ganchos pares de 1-7. Barra de escala = 150 μm (A), 25 μm (B, C), 20 μm (E-H), 15 μm (D, I)

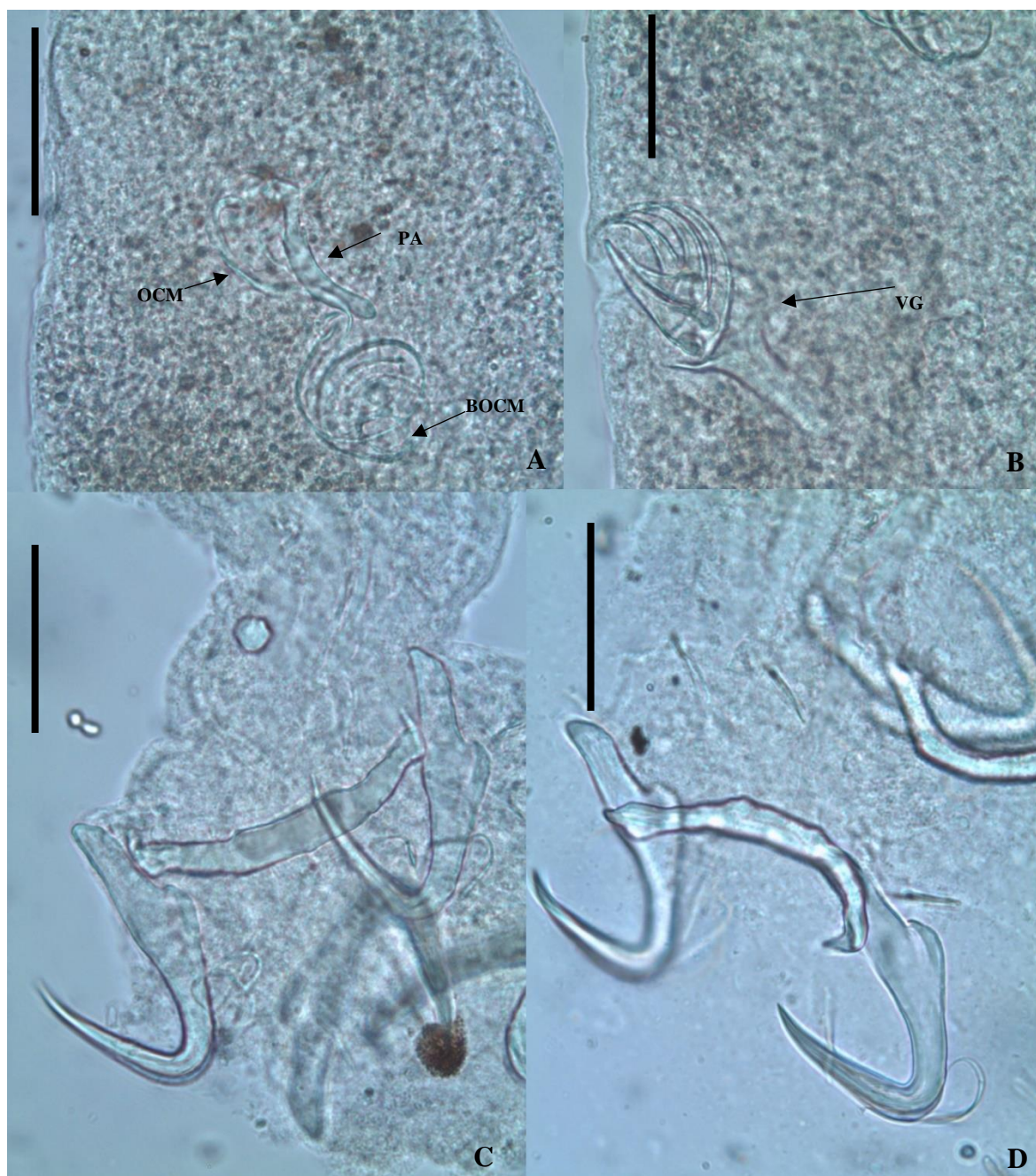


Figura 19 *Demidospemus* sp. n. parasita de *Phractocephalus hemioliopterus*, proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil. **A e D** - complexo copulatório, órgão copulatório masculino (OCM) em vista dorsal, base do órgão copulatório masculino (BOCM) e peça acessória (PA), **B** - vagina (VG)

em vista dorsal, **C** - barra e âncoras ventrais, **D** - barra e âncoras dorsais. Barra de escala= 25 µm (A), 25 µm (C–D), 15 µm (B)

Gênero: *Vancleaveus* Kritsky, Thatcher e Boeger, 1986

Espécie: *Vancleaveus cicinnus* Kritsky, Thatcher e Boeger, 1986 Figura 20

Hospedeiro tipo: *Phractocephalus hemioliopterus* (Bloch & Schneider, 1801), pirarara (Siluriformes, Pimelodidae).

Localidade tipo: Rio Solimões, próximo de Manaus, Amazonas, Brasil.

Sítio de infestação: Brânquias.

Presente registro: *Phractocephalus hemioliopterus*, Rio Tapajós (Bacia Amazônica – sub-bacia dos rios Amazonas, Tapajós, Juruena), Itaituba (04° 33' 10" S, 56° 17' 60" O), Santarém (02° 20' 13" S, 54° 52' 53" O); Igarapé Jari, Comunidade Jari do Socorro, Santarém (2° 20' 24" S, 54° 53' 59" O) Pará, Brasil.

Medidas (baseada em 15 espécimes: 9 corados com Tricrômico de Gomori e montados em balsamo do Canadá, 1 montados em meio de Grey e Wess, 3 montados em Hoyer + Gap, 2 montados em Gap + Grey): Corpo 453,5 (210 – 1032; n = 19) de comprimento; largura máxima 142,5 (48 – 221; n = 19). Faringe 29,5 (11 – 65,5; n = 12) de diâmetro. Haptor 72,5 (33,5 – 124,5; n = 19) de comprimento, 104 (51,5 – 151,5; n = 19) de largura. Âncora ventral 49 (41,5 – 62; n = 12) de comprimento, 30 (21,5 – 36; n = 12) de largura da base; âncora dorsal 42,5 (35 – 57; n = 12) de comprimento, 19 (11,5 – 27,5; n = 12) de largura da base. Barra ventral 55,5 (37 – 72; n = 17) de comprimento, distância entre extremidades 52 (32,5 – 71; n = 17); barra dorsal 49,5 (34 – 68,5; n = 14) de comprimento. Gancho Par 1 e 3: 27 (12 – 37; n = 21) de comprimento, par 2 e 4: 25,5 (15,5 – 36; n = 22) de comprimento, par 5: 18 (11,5 – 24; n = 8) de comprimento, par 6: 28,5 (16 – 35,5; n = 9), par 7: 29 (18 – 36; n = 6). OCM 66 (28 – 94; n = 11) de comprimento; peça acessória 57 (34,5 – 81; n = 14) de comprimento. Testículo 50,5 (n = 1) de comprimento, 25 (n = 1) de largura. Germário 103 (61,5 – 165,5; n = 9) de comprimento, 46,5 (32,5 – 79,5; n = 9) de largura. Ovo 128 (100 – 145,5; n = 3), 39,5 (33 – 38; n = 3) de largura.

Comentários: *Vancleaveus* foi proposto para acomodar espécies de Dactylogyridae parasitas de pimelodídeos, com as seguintes características: gônadas sobrepostas, OCM enrolado em sentido anti-horário, vagina ventral e raízes superficiais da âncora dorsal com uma dobra (Kritsky *et al.*, 1986b). Esse gênero é representado por 4 espécies, *V. cicinnus* Kritsky, Thatcher e Boeger, 1986, *V. fungulus* Kritsky, Thatcher e Boeger, 1986, *V. janauacaensis* Kritsky, Thatcher e Boeger, 1986 e *V. platyrhynchi* Kritsky, Thatcher e Boeger, 1986, todas reportadas a partir de espécimes encontrados no rio Amazonas, no Brasil e Peru e no rio Solimões no Brasil (Kritsky *et al.*, 1986b; Lopes *et al.*, 2009; Mendoza-Palmero *et al.*, 2012). As características de diagnose observadas nos espécimes do presente estudo, tais como morfologia do OCM e barras haptorais (Figura 20), correspondem àquelas para *V. cicinnus* (Kritsky *et al.*, 1986b) e seu encontro no rio Tapajós, nos municípios de Itaituba e Santarém representa novos registros de localidade.

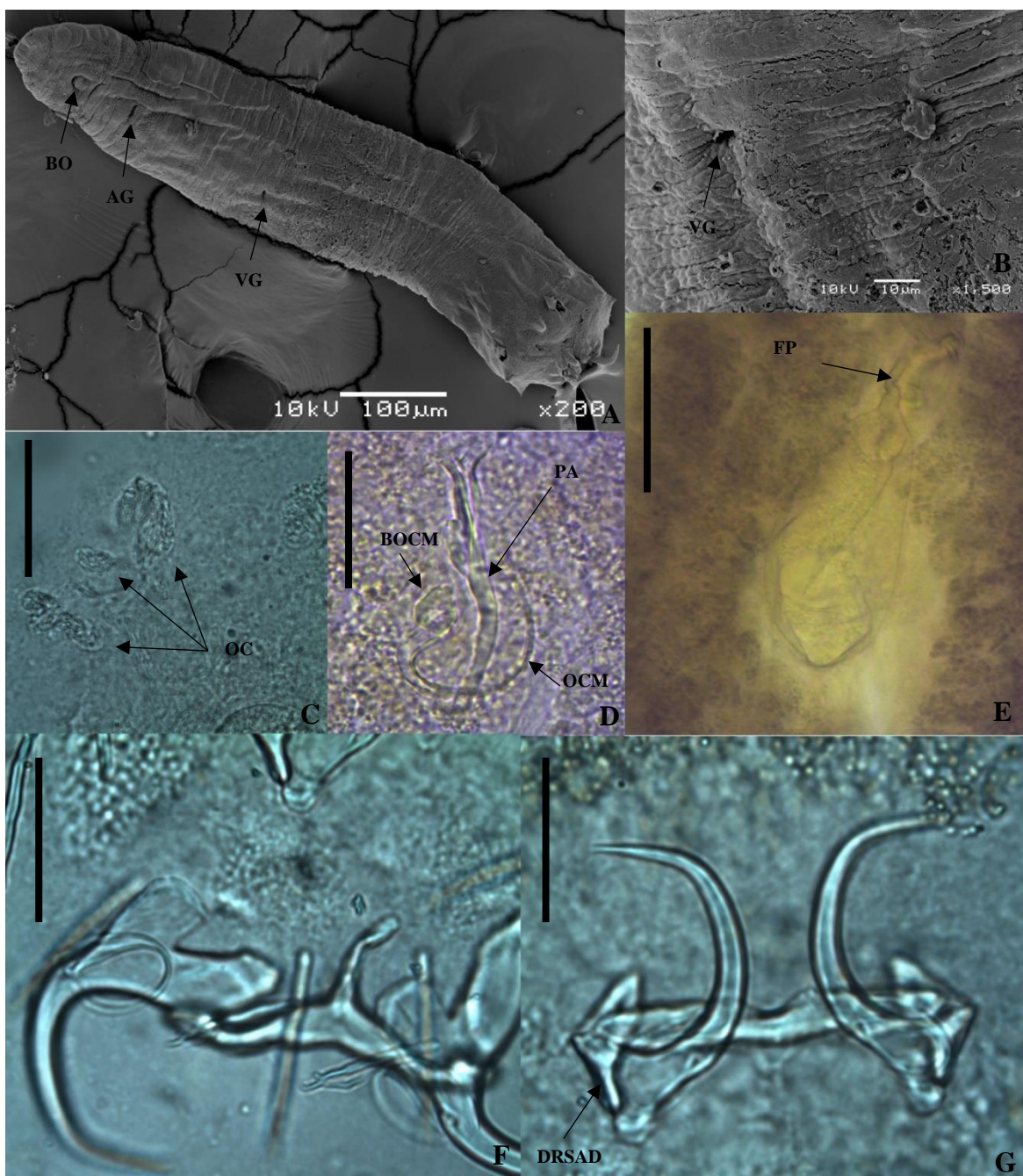


Figura 20 *Vancleaveus cicinnus* parasita de *Phractocephalus hemioliopterus*, proveniente do rio Tapajós, Pará, Brasil. **A** - helminto inteiro (boca: BO, abertura genital: AG, vagina: VG), **B** – vagina, **C** - órgão da cabeça (OC), **D** - complexo copulatório, órgão copulatório masculino (OCM), base do órgão copulatório masculino (BOCM) e peça acessória (PA), **E** - ovo com filamento polar (FP), **F** - barra e âncoras ventrais, **G** - barra e âncoras dorsais, com uma dobra na raiz superficial (DRSAD). Barra de escala = 25 μ m (F), 50 μ m (E), 20 μ m (D, G) e 10 μ m (C).

Gênero: *Unibarra* Suriano & Incorvaia, 1995

Espécie: *Unibarra paranoplatensis* Suriano & Incorvaia, 1995 Figura 21

Hospedeiro tipo: *Paulicea luetkeni* (Steindachner, 1876) (Sin. *Zungaro jahu* [Ihering, 1898] e *Zungaro zungaro* [Humboldt, 1821]), jáu (Siluriformes, Pimelodidae).

Localidade tipo: Rio Paraná, Puerto Itália, Província de Corrientes, Argentina.

Outros registros: *Pimelodus clarias maculatus* Lacepède, 1803 (Sin. *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803), Rio de La Plata, Buenos Aires, Argentina (Suriano e Incorvaia, 1995); *Aguarunichthys torosus* Stewart, 1986, Santa Clara, Iquitos, Peru (Mendoza-Palmero *et al.*, 2015).

Sítio de infestação: Brânquias.

Presente registro: *Phractocephalus hemioliopus* (Bloch & Schneider, 1801), pirarara (Siluriformes, Pimelodidae), Rio Tapajós (Bacia Amazônica – sub-bacia dos rios Amazonas, Tapajós, Juruena), Itaituba (04° 33' 10" S, 56° 17' 60" O), Santarém (02° 20' 13" S, 54° 52' 53" O); Igarapé Jari, Comunidade Jari do Socorro, Santarém (2° 20' 24" S, 54° 53' 59" O); *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821), Rio Tapajós, Itaituba (04° 33' 10" N, 56° 17' 60" W), Pará, Brasil.

Medidas (baseada em 3 espécimes: 2 corados com Tricrômico de Gomori e montados em balsamo do Canadá, 1 montado em Hoyer: Corpo 880 (628,5 – 1128,5; n = 3) de comprimento; largura máxima 298,5 (249,5 – 390,5; n = 3). Faringe 59,5 (n = 1) de diâmetro. Haptor 155,5 (130 – 201,5; n = 3) de comprimento, 307,5 (244 – 408,5; n = 3) de largura. Âncora ventral 68 (61 – 75; n = 2) de comprimento, 51 (49,5 – 52,5; n = 2) de largura da base; âncora dorsal 35,5 (34 – 36,5; n = 2) de comprimento, 32 (27,5 – 36; n = 2) de largura da base. Barra ventral 103,5 (88 – 126; n = 3) de comprimento, distância entre extremidades 88 (68 – 117; n = 3). Gancho Par 1 e 3: 45 (35 – 60; n = 3) de comprimento, par 2: 54,5 (50,5 – 62; n = 3) de comprimento, par 4: 45,5 (36 – 52,5; n = 3) de comprimento, par 5 e 6: 47 (41 – 54; n = 3) de comprimento, par 7: 58,5 (52 – 69; n = 3) de comprimento. OCM 110 (84,5 – 143,5; n = 3) de comprimento; peça acessória 119 (84,5 – 164,5; n = 3) de comprimento. Testículo 133,5 (114,5 – 153; n = 2) de comprimento, 107,5 (101 – 114,5; n = 2) de largura. Germário 87 (77 – 97,5; n = 2) de comprimento, 115 (86 – 144,5; n = 2) de largura.

Comentários: No presente trabalho encontramos espécimes de *Uni. paranoplatensis* em *P. hemioliopterus* e *Z. zungaro*, e as principais características diagnósticas são a presença de uma única barra no haptor, a ventral, vagina de posição ventral, e OCM sinuoso com peça acessória articulada com a base do OCM por meio de ligamento copulatório (Suriano e Incorvaia, 1995) (Figura 21). Espécimes morfologicamente muito semelhantes aos encontrados aqui foram registrados parasitando *Pimelodina flavipinnis* Steindachner, 1876, no rio Tocantins, município de Palmas, Estado do Tocantins, Brasil (BUENO, 2012).



Figura 21 *Unibarra paranoplatensis* parasita de *Zungaro zungaro* (B, C) e *Phractocephalus hemioliopus* (A, D, E e F), da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil. **A** - helminto inteiro, **B** - região anterior do corpo (vagina: VG), **C** - Complexo copulatório (órgão copulatório masculino: OCM,

base do OCM: BOCM, peça acessória: PA), **D** - Haptor (barra ventral: BV), âncoras, **E** - dorsal (AD) e **F** - ventral (AV). Barra de escala= 200 µm (A), 100 µm (B), 50 µm (C–F).

Gênero: **Gen. n.**

Espécie tipo: Gen. n. sp. n.

Hospedeiro tipo: *Phractocephalus hemioliopterus* (Bloch & Schneider, 1801), (Siluriformes, Pimelodidae).

Localidade tipo: Igarapé Jari, Rio Tapajós (Bacia Amazônica – sub-bacia dos rios Amazonas, Tapajós e Juruena), Santarém, Pará, Brasil (2° 20' 24" S – 54° 53' 59" O).

Outros hospedeiros: *Pseudoplatystoma tigrinum* (Valenciennes, 1840), (Siluriformes, Pimelodidae).

Outras localidades: Rio Tapajós, Itaituba, Pará, Brasil (04° 33' 10 S" – 56° 17' 60" O).

Sítio de infestação: Brânquias.

Diagnose: Corpo divisível em região cefálica, tronco e haptor. Tegumento fino, liso. Região cefálica com lobos laterais pobremente desenvolvidos. Pares bilaterais de órgãos da cabeça, abrindo subterminalmente na região cefálica; glândulas cefálicas bilateralmente dispostas, posteriores à faringe. Olhos ausentes. Boca subterminal, medioventral; faringe muscular, glandular. Dois cecos intestinais confluentes posteriormente às gônadas, sem divertículos. Poro genital medioventral, próximo ao nível de bifurcação do ceco intestinal. Átrio genital muscular. Gônadas sobrepostas; testículo dorsal ao germário. Canal deferente envolvendo dorsoventralmente o ceco esquerdo; vesícula seminal como uma expansão do vaso deferente, passando dorso-ventralmente antes de se ligar a base do órgão copulatório masculino. Um reservatório prostático, sacular. Complexo copulatório composto por órgão copulatório masculino (OCM), peça acessória, ligamento copulatório e bolsa do OCM. OCM tubular, esclerotizado, enrolado em sentido anti-horário; peça acessória esclerotizada, articulada com o órgão copulador masculino por meio de ligamento copulatório. Vagina não esclerotizada; abertura vaginal sinistral, marginal, anterior ao germário; atrio vaginal muscular; canal vaginal não esclerotizado, reto. Receptáculo seminal ausente. Vitelária bem desenvolvida, coextensiva com ceco e ausente nas regiões das estruturas dos sistemas reprodutivos. Haptor armado com 14 ganchos similares em forma e tamanho (7 pares)

com distribuição típica de ancirocefalíneos (Mizelle, 1936). Par de âncoras ventral e dorsal; âncoras com raízes superficiais e profundas. Barra ventral e dorsal; barra ventral com processo anteromedial. Parasitas de brânquias de peixes siluriformes.

Comentários: Gen. n. é suportado pela proposta filogenética do presente estudo (Figura 24) e é definido pela presença dos seguintes caracteres: 1) gônadas sobrepostas; 2) OCM enrolado em sentido anti-horário, lembrando um saca-rolhas e envolto em uma bolsa do OCM; 3) peça acessória reduzida e articulada com a base do órgão copulatório masculino por meio de ligamento copulatório; 4) vagina sinistra e marginal; 5) barra ventral com projeção anteromedial; e 6) âncoras com raízes superficial e profunda bem definidas (Figuras 22 e 23). Gen. n. apresenta morfologia geral similar a de *Ameloblastella* Kritsky, Mendoza-Franco e Scholz, 2000, mas pela morfologia do OCM, o qual lembra um saca-rolhas, assemelha-se aos gêneros neotropicais *Unilatus* Mizelle & Kritsky, 1967 e *Whittingtonocotyle* Neto, Rodrigues e Domingues, 2015, e a algumas espécies neárticas do gênero *Onchocleidus* Mueller, 1936 (Mizelle, 1936; Mizelle e Regensberger, 1945; Mizelle e Kritsky, 1967; Beverley-Burton, 1984; Kritsky *et al.*, 2000; Neto *et al.*, 2015).

Todavia, o novo gênero difere de *Ameloblastella*, *Unilatus*, *Whittingtonocotyle* e *Onchocleidus* por apresentar uma bolsa do OCM (estrutura ausente nos demais gêneros) e pela peça acessória reduzida (peça acessória conspicua nos demais gêneros). O Gen. n. se distingue de *Ameloblastella* também por apresentar o OCM enrolado em forma de saca-rolhas, com voltas curtas (enrolado com anéis em *Ameloblastella*) (Kritsky *et al.*, 2000). Em relação a *Unilatus*, o novo gênero difere por não apresentar bulbo na porção medial do OCM (presente em *Unilatus*); pela presença de um ligamento copulatório que articula a peça acessória com a base do OCM (ausente em *Unilatus*); por não apresentar os complexos âncoras/barras apenas no lado dorsal do haptor, como visto em *Unilatus*; e pela abertura vaginal sinistra marginal (médio ventral em *Unilatus*) (Mizelle e Kritsky, 1967). E, embora Gen. sp. apresente um OCM enrolado em forma de saca-rolhas, similar ao OCM de *Whittingtonocotyle*, *Onchocleidus principalis* Mizelle, 1936 e *Onchocleidus helici* Mueller, 1936 (Mizelle, 1936; Mizelle e Regensberger, 1945; Neto *et al.*, 2015), o novo gênero se distingue desses gêneros pela abertura vaginal, a qual se dá no lado direito do tronco nesses táxons (a esquerda em Gen. n.); e pela presença de um ligamento copulatório em Gen. n. (ausente nos demais táxons).

Espécie: Gen. n. sp. n.. Figuras 22 e 23

Descrição (baseada em 17 espécimes: 9 corados com Tricrômico de Gomori e montados em balsamo do Canadá, 7 montados em meio de Grey & Wess e 1 montado em GAP + Grey e Wess):

Corpo 304 (230 – 374; n = 17) de comprimento, em forma de sino; largura máxima 105 (65 – 176; n = 15), ao nível médio do corpo. Região cefálica distinta do tronco, com lobos cefálicos laterais pouco desenvolvidos; seis pares de órgãos da cabeça presentes, cada par se abrindo um conjunto de glândulas cefálicas posteriores à faringe. Olhos ausentes; grânulos cefálicos ausentes. Faringe 31 (17 – 49; n = 13) de diâmetro; esôfago ausente; dois cecos intestinais confluentes após o testículo, surgem a partir da faringe. Pedúnculo ausente; haptor 43 (23 – 60; n = 17) de comprimento, 93 (53 – 134; n = 16) de largura, hexagonal, com quatro manchas glandulares laterais (um par ventral e um par dorsal). Âncora ventral 30 (25 – 38; n = 16) de comprimento, 16 (11 – 18; n = 14) de largura da base; âncora dorsal 35 (24 – 49; n = 16) de comprimento, 16 (12 – 21; n = 14) de largura da base, ambas com raízes bem definidas, dorsal com raíz superficial mais desenvolvida do que a raíz profunda, lâmina curta e ligeiramente curva na ventral e reta na dorsal, e com ponta reta e alongada, ultrapassando a raiz superficial. Barra ventral 56 (39 – 81; n = 16) de comprimento, distância entre extremidades 46 (20 – 74; n = 16), em forma de “U” expandido, com uma projeção anteromedial, extremidades dilatadas e arredondadas; barra dorsal 59 (44 – 86; n = 17) de comprimento, distância entre extremidades 48 (23 – 75; n = 16), reta ou ligeiramente curva, com concavidade anteromedial, e extremidades levemente afiladas. Ganchos similares na forma e comprimento, robustos, relativamente longos, com ponta inconspícua, lâmina curva, polegar ereto, com dilatação proximal, sucedida por afunilamento da haste, que se afunila distalmente; par 1, 17 (13 – 22; n = 9); par 2 e 7 19 (12 – 28; n = 18); pares 3, 4 e 6 21 (12 – 26; n = 30); par 5 15 (10 – 19; n = 9) de comprimento. Poro genital medioventral, ao nível da bifurcação do ceco intestinal. Órgão copulatório masculino (OCM) 77 (45 – 120; n = 16) de comprimento; diâmetro do primeiro anel do OCM 7 (6 – 12; n = 17); enrolado em sentido anti-horário, lembrando um saca-rolhas, base expandida, semicircular; peça acessória 6 (3 – 11; n = 15) de comprimento, reduzida, articulada com a base do OCM por meio de ligamento copulatório. Um reservatório prostático. Gônadas sobrepostas. Testículo 96 (52 – 162; n = 8) de comprimento, 34 (22 – 56; n = 6) de largura, dorsal ao germário, oval; canal deferente surgindo da região médio-anterior do testículo, envolvendo dorso-ventralmente o ramo esquerdo do ceco intestinal, direcionando-se para o lado direito do tronco, se torce ventralmente para a região anterior, se dilata formando a vesícula seminal e se torce

ventralmente, para em sentido posterior se ligar a base do OCM. Vagina sinistra, com átrio e canal vaginal não esclerotizado; canal vaginal reto, em ângulo de 45° com relação ao tronco. Útero presente; oótipo na base do útero; receptáculo seminal não observado. Germário 95 (69 – 117; n = 10) de comprimento, 34 (26 – 46; n = 8) de largura, oval. Vitelária bem desenvolvida, coextensiva com ceco e ausente nas regiões das estruturas dos sistemas reprodutivos.

Comentários: Gen. n. sp. n. é a espécie tipo do gênero. A nova espécie é caracterizada por apresentar: 1) OCM enrolado em sentido anti-horário, contendo de 4 – 5 voltas, conformadas como um saca-rolhas; 2) vagina não esclerotizada, com átrio vaginal em forma de taça; 3) âncoras com raízes bem definidas, dorsal com raiz superficial bem mais desenvolvida do que a raiz profunda (Figuras 22 e 23).

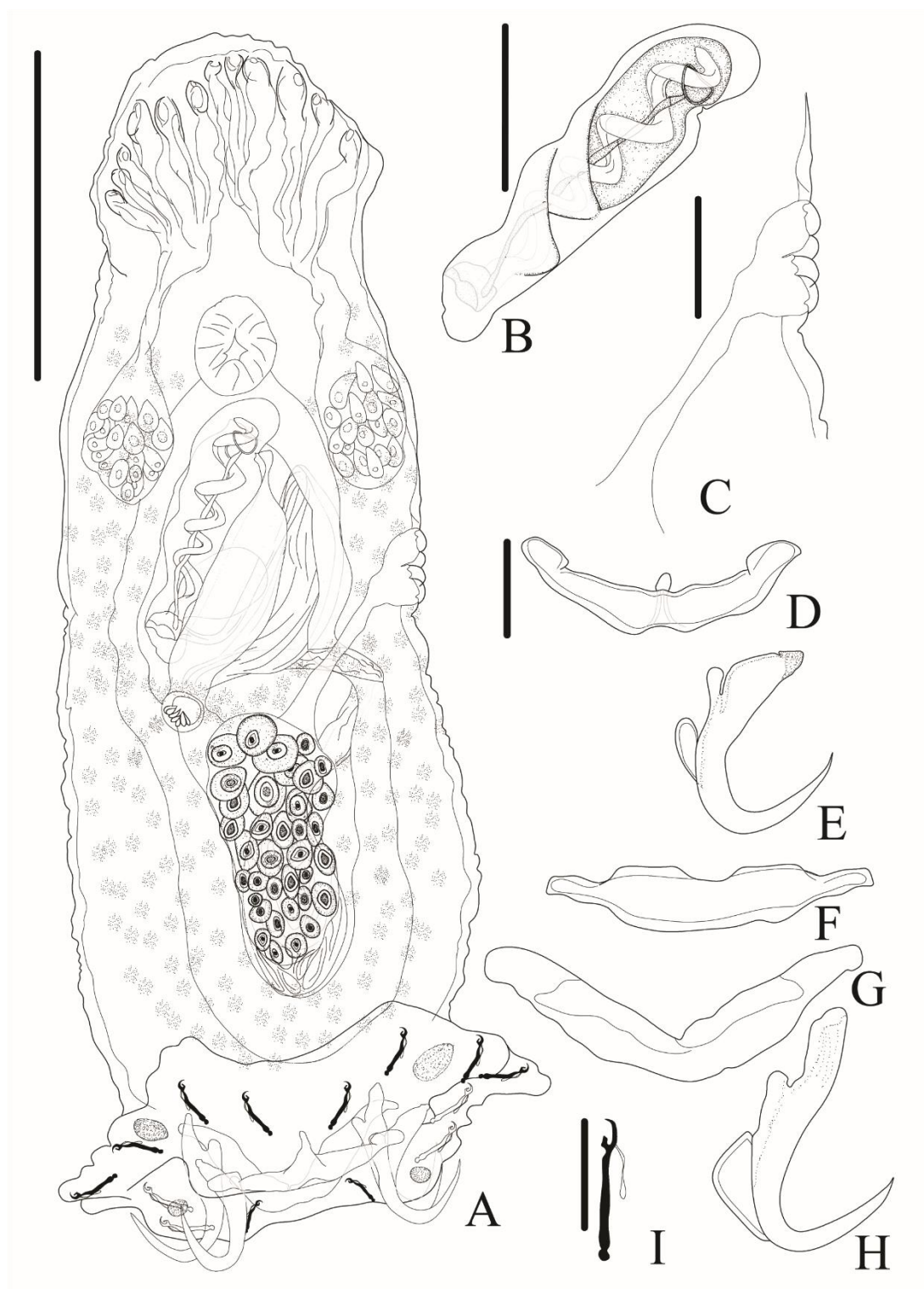


Figura 22 Gen. n. sp. n. parasita de *Phractocephalus hemioliopterus*, proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil. **A** - desenho composto do helminto inteiro, **B** - órgão copulatório masculino,

C - vagina, D - barra ventral E e F - barra dorsal, G - gancho H âncora ventral, I - âncora dorsal.
Barra de escala = 100 μm (A), 25 μm (C), 20 μm (B), 15 μm (D – I)

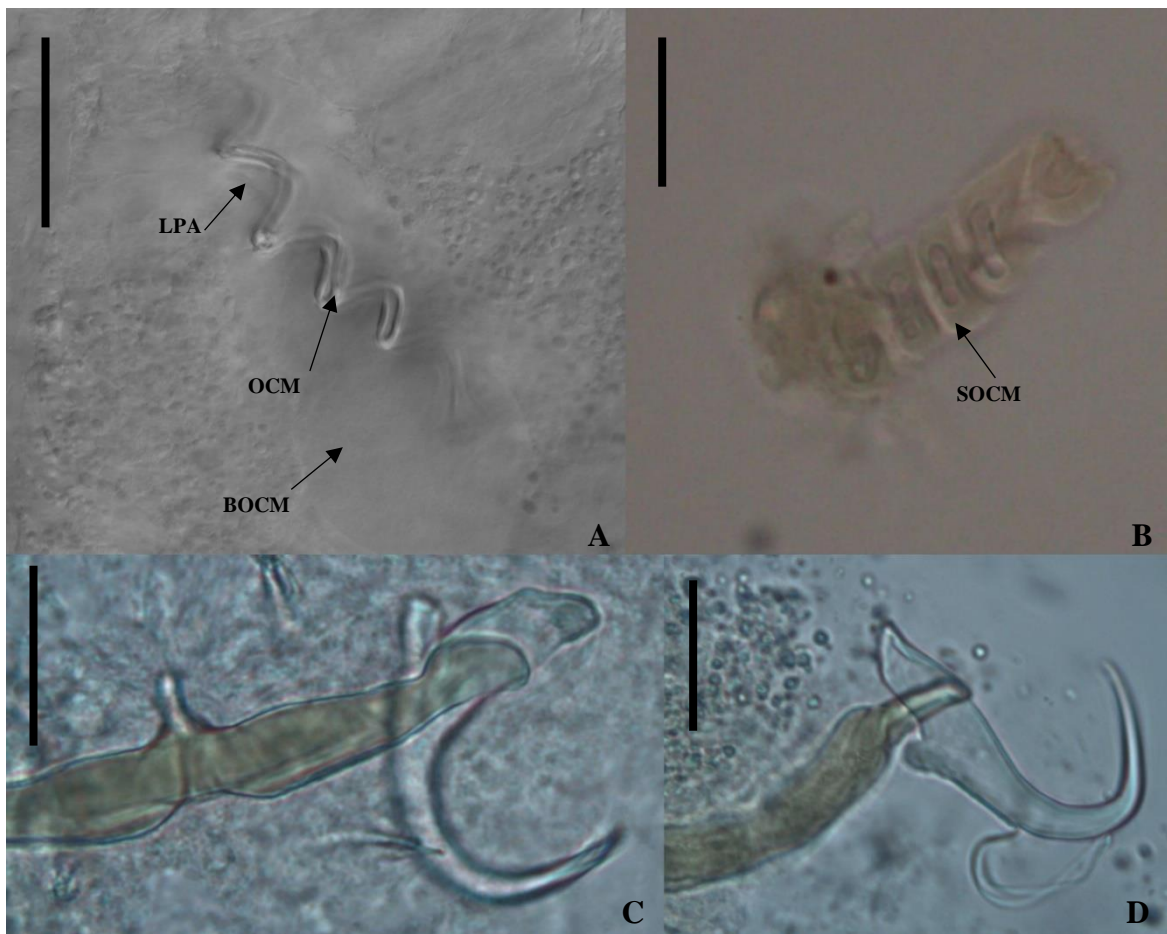


Figura 23 Gen. n. sp. n. parasita de *Phractocephalus hemioliopterus*, proveniente da bacia rio Tapajós, Pará, Brasil. **A** - complexo copulatório, órgão copulatório masculino (OCM), base do órgão copulatório masculino (BOCM), ligamento da peça acessória (LPA) à base do OCM e **B** - bolsa que envolve o OCM (SOCM), **C** - Barra e âncora ventral, **D** - Barra e âncora dorsal. Barra de escala= 15 μm

8.3.2. Caracterização das sequências de 18S rDNA

As sequências do 18S rDNA obtidas no presente estudo variaram entre 1631 até 1872 pb, e alinharam em meio a outras sequências de dactilogirídeos, da posição 3' 111 até 5' 2031. No presente estudo, foram obtidas sequências do 18S de algumas espécies descritas anteriormente, cuja morfologia não foi objeto do presente estudo ou, como é caso de *Pavanelliella* sp. n e *Ameloblastella* sp. n., foram descritas nos capítulos anteriores da presente tese. Contudo, abaixo segue a Tabela 5 contendo informações sobre as sequências disponibilizadas e hospedeiro nos quais os parasitas foram encontrados. Mais detalhes sobre o local de coleta podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 5 Tamanho e posição relativa das sequências de 18S rDNA obtidas no presente estudo

Espécie	N. de pares de base	Intervalo 3' – 5' 18S	Hospedeiro
<i>U. malabaricus</i>	1631	347 – 2031	<i>Hoplias malabaricus</i>
<i>P. takemotoi</i>	1769	212 – 2031	<i>Pimelodus maculatus</i>
<i>Pavanelliella</i> sp. n.	1811	166 – 2031	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>
<i>P. pavannellii</i>	1796	183 – 2031	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>
<i>P. pavannellii</i>	1805	173 – 2031	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>
Gen. n. sp. n.	1808	111 – 2031	<i>Phractocephalus hemioliopus</i>
<i>Un. paranoplatensis</i>	1841	120 – 2031	<i>Phractocephalus hemioliopus</i>
<i>Ameloblastella</i> sp. n.	1838	123 – 2031	<i>Phractocephalus hemioliopus</i>
<i>V. cicinnus</i>	1872	89 – 2031	<i>Phractocephalus hemioliopus</i>
<i>D. amazonensis</i> n. comb.	1842	100 – 2009	<i>Phractocephalus hemioliopus</i>
<i>D. catus</i> n. comb.	1842	101 – 2010	<i>Phractocephalus hemioliopus</i>
<i>Demidospermus</i> sp. n.	1802	163 – 2031	<i>Phractocephalus hemioliopus</i>
<i>Demidospermus valenciennesi</i>	1793	172 – 2031	<i>Pimelodus maculatus</i>
<i>Demidospermus paravalenciennesi</i>	1792	323 – 2031	<i>Pimelodus maculatus</i>
<i>Demidospermus bidiverticulatum</i>	1782	184 – 2031	<i>Pimelodus maculatus</i>
<i>Demidospermus uncusvalidus</i>	1649	173 – 2031	<i>Pimelodus maculatus</i>

8.3.3. Hipótese filogenética

No presente estudo, um alinhamento não ambíguo com 84 unidades taxonômicas operacionais (OTU) produziu uma matriz abrangendo 1802 caracteres informativos. As inferências

filogenéticas baseadas em ML e BI, selecionaram automaticamente o melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos como o *General Time Reversible* (GTR), com o submodelo G + I + F para a ML e o submodelo 123451 para a BI. A BI resultou em uma árvore de consenso de maioria selecionada entre 4.502 amostras de 6.002 árvores lidas.

A árvore de consenso de maioria gerada pela BI (Figura 24) mostra a relação evolutiva entre seis principais linhagens de Dactylogyridae (A–F). A linhagem A é representada por ancirocefalíneos parasitas de peixes de água doce neotropicais. Essa linhagem tem como grupo irmão, a linhagem B, na qual estão dactilogirídeos parasitas de siluriformes, divididos em três principais clados. Em um deles estão *Bychowskyella fossilisi* Majumdar & Agarwal, 1989 e *Bychowskyella tchangi* Gussev, 1976, formando um clado irmão dos outros dois. Dentro desses dois outros clados irmãos, há ancilodiscoidíneos marinhos da região Oriental em um deles e, no outro, ancirocefalíneos de água doce neotropicais. As linhagens C–F são proximamente relacionadas entre si, e irmãs das linhagens A–B. Ancirocefalíneos marinhos da região Saharo-Árabe representam a linhagem C, a qual é irmã das demais linhagens dentro desse grupo (C, (D, (E, F))). *Dactylogyrus falciformis* (Achmerov, 1952), parasita de um cipriniforme Saharo-árabe é o único representante da linhagem D, a qual é irmã das linhagens E+F. Na linhagem E há membros de Pseudodactylogyrinae, parasitas de anguiliformes e perciformes das regiões Paleártica e Sino-Japonesa, respectivamente, os quais são irmãos de ancirocefalíneos marinhos, parasitas de perciformes das regiões da Oceania, Australia e Oriental. A linhagem F é exclusivamente formada por ancirocefalíneos marinhos parasitas de perciformes das regiões da Australia e Oceania, Saharo-Árabe e Neotropical.

As árvores de ML e de BI convergiram para topologias muito parecidas, por isso optou-se por exibir apenas a árvore de BI. Entre as incongruências apresentadas por essas duas topologias dentro de Dactylogyridae, há um conflito na posição de *Euryhaliotrema annulocirrus* (Yamaguti, 1968) e de *Euryhaliotrema berenguelae* (Plaisance & Kritsky, 2004). Na árvore de ML (não mostrada) *E. annulocirrus* surgiu como grupo irmão de *Euryhaliotrema grandis* (Mizelle & Kritsky, 1969), compondo um clado irmão de *E. berenguelae* + *Euryhaliotrema aspistis* (Plaisance & Kritsky, 2004). O outro ponto divergente apresentado pela árvore de ML, sugere que *D. falciformis* é grupo irmão dos ancirocefalíneos marinhos *Protogyrodactylus amacleithrium* (Price & McClellan, 1969) + *Protogyrodactylus johnstonetti* Price & Pike, 1969, e que esse clado é irmão do clado formado por pseudodactilogiríneos e duas linhagens de ancirocefalíneos marinhos

(Dactylogyrinae, *Protyrodactylus* spp., Pseudodactylogyrinae, *Haliotrema*, *Tetrancistrum*, *Pseudohaliotrema*, *Euryhaliotrema*, *Placodiscus*, *Haliotrematoides*) (D, C), (E, F)). As demais relações filogenéticas apresentadas pela árvore de ML foram congruentes com as apresentadas pela BI e suportam as novas combinações e a proposta de novo gênero apresentadas neste estudo.

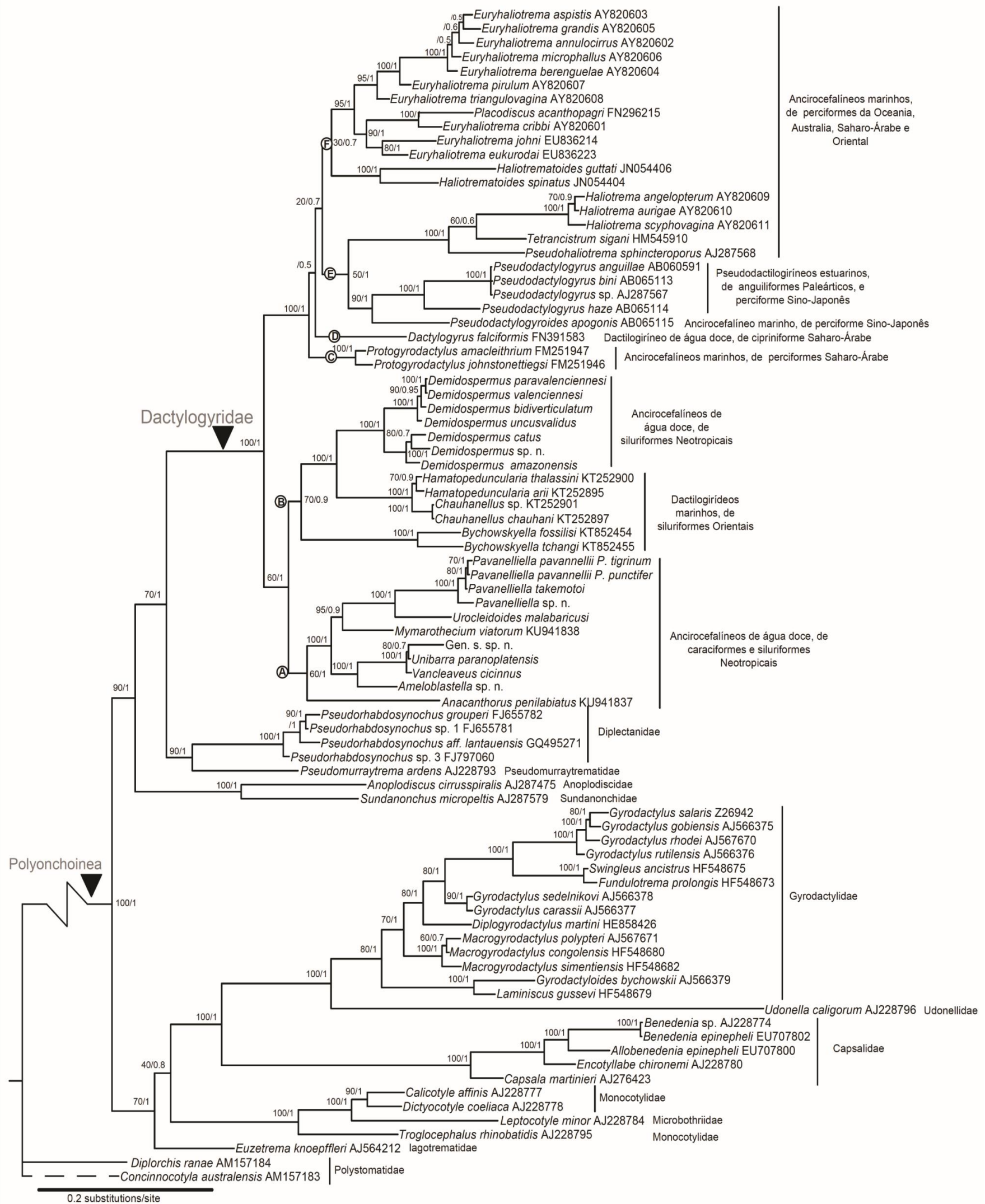


Figura 24 Árvore de consenso de maioria, como sugerida pela Inferência Baiesiana (BI) com base no sequenciamento do gene 18S rDNA. Suporte por *Bootstrap* (ML) e Probabilidade posterior (BI) são mostrados nos nós de cada clado .

8.4. DISCUSSÃO

Dezesseis novas sequências do gene 18S rDNA de dactilogirídeos neotropicais foram providenciadas no presente estudo. Essas sequências contribuíram para o entendimento parcial das relações evolutivas das linhagens que compõe a família e à medida que novas sequências forem adicionadas, certamente novas hipóteses trarão esclarecimentos para as complexas relações evolutivas que envolvem esses organismos. Com base na proposta filogenética apresentada aqui, descreveu-se uma nova espécie de *Demidospermus*, propôs-se a transferência de duas espécies anteriormente consideradas *incertae sedis* (Kritsky *et al.*, 1986b) para o gênero *Demidospermus* (i.e. *D. amazonensis* n. comb. e *D. catus* n. comb.) e propôs-se um novo gênero para alojar Gen. n. sp. n. Entretanto, reconhecemos a fragilidade da proposta relativa as espécies de *Demidospermus*, sobretudo considerando que a monofilia do gênero foi recentemente contestada (Mendoza-Palmero *et al.*, 2015).

Recentemente a monofilia de *Demidospermus* foi contestada (Mendoza-Palmero *et al.*, 2015) e, evidências que sugerem uma delimitação do gênero às espécies parasitas de brânquias de loricariídeos e que compartilham barras haptorais articuladas, tem surgido (Franceschini *et al.*, 2017). Contudo, a topologia apresentada pela árvore de BI (Figura 24), com base em forte suporte, favorece a hipótese de monofilia de *Demidospermus*, visto que dentro da linhagem B, mesmo com a formação de dois clados, estes foram proximamente relacionados com forte valor de suporte. Corroboram ainda neste sentido, o fato de que *D. amazonensis* n. comb. e *D. catus* n. comb., anteriormente classificados em *Urocleidoides* (Mizelle e Price, 1964), carecem de esclerito associado a vagina; que, *Demidospermus* sp. n., embora possua um esclerito vaginal, este está dentro do canal e átrio vaginal, não associado a vagina, e portanto não homólogo ao esclerito vaginal presente em espécies de *Urocleidoides*; e que essas espécies estão distantemente relacionadas a *Uro. malabaricus*. Porém, no presente estudo não foi analisada nenhuma espécie de *Demidospermus* parasita de loricariídeo e embora *D. amazonensis* n. comb., *D. catus* n. comb. e *Demidospermus* sp. n. sejam proximamente relacionadas a *Demidospermus paravalenciennesi*, *Demidospermus valenciennesi*, *Demidospermus bidiverticulatum* e *Demidospermus uncusvalidus*, é provável que elas pertençam a uma linhagem diferente de *Demidospermus sensu* Franceschini *et al.* (2017). No entanto, a falta de evidências claras baseadas em homologia de caracteres

morfológicos que possam sustentar uma proposta de novos gêneros para alocar essas espécies adequadamente, inviabiliza qualquer proposta nesse sentido no presente estudo.

A proposta do gênero novo é suportada pela relação filogenética distante entre Gen. n. sp. n. e *Ameloblastella* sp. n. (Figura 24). Considerando os caracteres morfológicos, Gen. n. sp. n. apresenta uma bolsa do OCM que o distingue de todos os gêneros morfológicamente semelhantes a ele (*Ameloblastella*, *Unilatus*, *Whittingtonocotyle* e *Onchocleidus*); a morfologia do seu OCM, enrolado em forma de saca-rolhas também o torna distinto de *Ameloblastella*; e a abertura vaginal sinistra marginal o distingue das espécies que possuem um OCM em forma de saca-rolhas (*i.e.* *Whittingtonocotyle* spp., *O. principalis* e *O. helcis*) (Mizelle, 1936; Mizelle e Regensberger, 1945; Kritsky *et al.*, 2000; Neto *et al.*, 2015). Embora não seja objeto do presente estudo, a similaridade morfológica do OCM das espécies de *Whittingtonocotyle* com *O. principalis* e *O. helcis*; a posição da vagina, dextral; e a presença de uma projeção anteromedial na barra dorsal de *O. helcis*, sugere que essas espécies podem ser proximamente relacionadas.

Os resultados filogenéticos obtidos no presente estudo corroboram que Ancyrocephalinae não é um agrupamento natural (Bychowsky, 1961; Kritsky e Boeger, 1989; Šimková *et al.*, 2003; Plaisance *et al.*, 2005; Šimková, Matejusova, *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Dang *et al.*, 2010; Mendlová *et al.*, 2010; Blasco-Costa *et al.*, 2012; Mendoza-Palmero *et al.*, 2015). Contudo, não esclarecem as complexas relações evolutivas entre dactilogiríneos, pseudodactilogiríneos e ancirocefalíneos parasitas de perciformes marinhos. Em grande parte dos estudos com base em inferência filogenética molecular (Šimková *et al.*, 2003; Šimková, Matejusova, *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Dang *et al.*, 2010; Mendlová *et al.*, 2010; Blasco-Costa *et al.*, 2012), Dactylogyrinae surge como grupo irmão de Pseudodactylogyrinae + ancirocefalíneos marinhos + ancirocefalíneos parasitas de perciformes afrotropicais de água doce. Outros no entanto, sugerem outras hipóteses, que colocam por exemplo, Pseudodactylogyrinae como grupo irmão para as demais linhagens desse grupo de dactilogirídeos (Šimková *et al.*, 2003), ou que propõe Pseudodactylogyrinae + Dactylogyrinae como grupo irmão das linhagens de ancirocefalíneos marinhos + ancirocefalíneos parasitas de perciformes afrotropicais de água doce. No presente estudo, ancirocefalíneos marinhos (linhagem C) surgiram como grupo irmão de Dactylogyrinae (D), o qual é irmão de um clado composto por uma linhagem de ancirocefalíneos marinhos (F) + Pseudodactylogyrinae + outra linhagem de ancirocefalíneos marinhos (E) (Figura 24). Todas as hipóteses referentes a essa linhagem que envolve dactilogiríneos, pseudodactilogiríneos, ancirocefalíneos marinhos parasitas

de perciformes e ancirocefalíneos de água doce parasitas de perciformes afrotropicais, são fragilizadas pela falta de robustez dos suportes dos ramos, que na melhor das situações é apenas moderado.

Diante dos cenários de extrema complexidade evolutiva apresentada por dactilogirídeos, torna-se necessário admitir que podem haver inúmeras e distintas histórias evolutivas para cada grupo dentro de Dactylogyridae. Assim, como outrora acreditava-se que a especificidade parasitária de dactilogirídeos era majoritariamente decorrente de processos co-evolutivos, o que mostrou-se mais tarde ser mais frequentemente uma consequência de processos de especiação simpátrica intra-hospedeiro (Šimková *et al.*, 2004; Šimková, Matejusova, *et al.*, 2006; Šimková, Verneau, *et al.*, 2006; Mendlová *et al.*, 2012), hoje assumimos que a evolução provavelmente atuou diferentemente nas diferentes linhagens de Dactylogyridae. Os resultados do presente estudo evidenciam que os siluriformes neotropicais foram colonizados em pelo menos três eventos independentes, dois na linhagem A, em ambientes de água doce e um na linhagem B, na qual aparentemente o hospedeiro siluriforme é uma condição simplesiomórfica, e que pode representar uma linhagem de dactilogirídeos parasitas exclusivos de bagres, como anteriormente sugerido (Gusev, 1961; Lim *et al.*, 2001; Mendoza-Palmero *et al.*, 2015). Contudo, processos evolutivos similares podem ter ocorrido inúmeras vezes na história evolutiva de Dactylogyridae. O mesmo se dá para os eventos de colonização secundária do ambiente marinho e o retorno a ambientes de água doce, o que parece ter ocorrido dentro da linhagem B, e inúmeras vezes nas linhagens C–F.

8.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J. C.; CECCARELLI, P. S.; LUQUE, J. L. Two new species of *Pavanelliella* (Monogenea, Dactylogyridae) parasitic on pimodolid fishes from Mogi Guaçu river, Southeastern Brazil, and notes on the morphology of *P. pavanellii*. **Neotropical Helminthology**, v. 5, n. 2, p. 213–224, 2011. ISSN 1995-1043.

BEVERLEY-BURTON, M. Monogenea and Turbellaria. **Guide to the parasites of fishes of Canada. Part I. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 74, p. 209, 1984.

BLASCO-COSTA, I.; MIGUEZ-LOZANO, R.; SARABEEV, V.; BALBUENA, J. A. Molecular phylogeny of species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) and their affinities within the Dactylogyridae. **Parasitology International**, v. 61, n. 4, p. 619-27, Dec 2012. ISSN 1873-0329 (Electronic) 1383-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22742900> >.

BRANCHES, B.; DOMINGUES, M. A new species of *Unilatus* (Platyhelminthes: Monogenoidea) from the gills of *Leporacanthicus galaxias* Isbrücker et Nijssen (Siluriformes: Loricariidae) from Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 59, n. 1, p. 91-97, 2014. ISSN 1896-1851.

BUCHMANN, K.; BRESCIANI, J. Monogenea (Phylum Platyhelminthes). In: WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish diseases and disorders**. London, UK: CAB International, v.1, 2006. p.297-344. ISBN 0-85199-015-0.

BYCHOWSKY, B. E. Monogenetic trematodes: their systematics and phylogeny. **American Institute of Biological Sciences**, 1961.

CEPEDA, P. B.; LUQUE, J. L. Three new species of *Demidospermus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic on *Brachyplatystoma filamentosum* (Siluriformes: Pimelodidae) from the Araguaia River, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 5, p. 869–873, Oct 2010. ISSN 1937-2345 (Electronic) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20486742> >.

COHEN, S. C.; JUSTO, M. C. N.; KOHN, A. **South American Monogenoidea Parasites of Fishes, Amphibians and Reptiles**. Rio de Janeiro: Oficina de Livros, 2013. 663 ISBN 9788590702719. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=OU3unQEACAAJ> >.

COHEN, S. C.; KOHN, A. New data on species of *Demidospermus* (Dactylogyridae, Monogenea) parasitizing fishes from the reservoir of the Itaipu hydroelectric power station, Parana state, Brazil, with new synonymies. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 167-170, 2008.

DANG, B. T.; LEVSEN, A.; SCHANDER, C.; BRISTOW, G. A. Some *Haliotrema* (Monogenea: Dactylogyridae) from cultured grouper (*Epinephelus* spp.) with emphasis on the phylogenetic position of *Haliotrema cromileptis*. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 30-39, Feb 2010. ISSN 1937-2345 (Electronic) 0022-3395 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19697969> >.

DOMINGUES, M. V.; SOARES, G. B.; WATANABE, A. Monogenoidea (Polyonchoinea: Dactylogyridae) parasitizing the gills of marine catfish (Siluriformes: Ariidae) inhabiting the Atlantic Amazon Coast of Brazil. **Zootaxa**, v. 4127, n. 2, p. 301, 2016. ISSN 1175-5334.

FRANCESCHINI, L.; ZAGO, A. C.; MÜLLER, M. I.; FRANCISCO, C. J.; TAKEMOTO, R. M.; DA SILVA, R. J. Morphology and molecular characterization of *Demidospermus spirophallus* n. sp., *D. prolixus* n. sp. (Monogenea: Dactylogyridae) and a redescription of *D. anus* in siluriform catfish from Brazil. **Journal of Helminthology**, p. 1–16, 2017. ISSN 0022-149X.

GEER, L. Y.; MARCHLER-BAUER, A.; GEER, R. C.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; LIU, C.; SHI, W.; BRYANT, S. H. The NCBI biosystems database. **Nucleic Acids Research**, p. gkp858, 2009. ISSN 0305-1048.

GUSEV, A. V. New subfamily of monogeneans (Monogenoidea). **Doklady Akademii Nauk**, v. 139, p. 1480–1482, 1961.

KARLING, L. C.; LOPES, L. P. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. New species of *Tereancistrum* (Dactylogyridae) monogenean parasites of *Schizodon borellii* (Characiformes, Anostomidae) from Brazil, and emended diagnosis for *T. parvus*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 365-369, 2014. ISSN 1807-863X.

KRITSKY, D. C.; BOEGER, W. A. The phylogenetic status of the Ancyrocephalidae Bychowsky, 1937 (Monogenea, Dactylogyroidea). **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 207–211, 1989.

KRITSKY, D. C.; GUTIÉRREZ, P. A. Neotropical Monogenoidea. 34. Species of *Demidospermus* (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae) from the gills of Pimelodids (Teleostei, Siluriformes) in Argentina. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v. 65, p. 147–159, 1998.

KRITSKY, D. C.; MENDOZA-FRANCO, E. Neotropical Monogenoidea. 42. *Pavanelliella scaphiocotylus* sp. nov. (Dactylogyridae) from the Nasal Cavity of the Guatemalan Chulin, *Rhamdia guatemalensis* (Siluriformes: Heptapteridae), from a Cenote on the Yucatán Peninsula, Mexico. **Comparative Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 136–139, 2003. ISSN 1525-2647.

KRITSKY, D. C.; MENDOZA-FRANCO, E.; SCHOLZ, T. Neotropical Monogenoidea. 36. Dactylogyrids from the gills of *Rhamdia guatemalensis* (Siluriformes: Pimelodidae) from cenotes of the Yucatan Peninsula, Mexico, with proposal of *Ameloblastella* gen. n. and *Aphanoblastella* gen. n. (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae). **Comparative Parasitology**, v. 67, n. 1, p. 76–84, 2000.

KRITSKY, D. C.; MENDOZA-FRANCO, E. F.; BULLARD, S. A.; VIDAL-MARTÍNEZ, V. M. Revision of the amphiamerican *Neotetraonchus* Bravo-Hollis, 1968 (Monogenoidea: Dactylogyridae), with a description of *N. vegrandis* n. sp. from the gill lamellae of the blue sea catfish *Ariopsis guatemalensis* (Siluriformes: Ariidae) off the Pacific Coast of Mexico. **Systematic Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 1, 2009. ISSN 0165-5752.

KRITSKY, D. C.; THATCHER, V.; BOEGER, W. Neotropical Monogenea. 8. Revision of *Urocleidoides* (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 53, n. 1, p. 1-37, 1986a.

KRITSKY, D. C.; THATCHER, V. E.; BOEGER, W. A. Neotropical Monogenea. 8. Revision of *Urocleidoides* (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 53, p. 1–37, 1986b.

KRITSKY, D. C.; YANG, T.; SUN, Y. Dactylogyrids (Monogenoidea, Polyonchoinea) parasitizing the gills of snappers (Perciformes, Lutjanidae): Proposal of *Haliotrematoides* n. gen.

and descriptions of new and previously described species from marine fishes of the Red Sea, the eastern and Indo-west Pacific Ocean, Gulf of Mexico and Caribbean Sea. **Zootaxa**, v. 1970, p. 1–51, 2009. ISSN 1175-5326.

LIM, L.; TIMOFEEVA, T.; GIBSON, D. Dactylogyridean monogeneans of the siluriform fishes of the Old World. **Systematic Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 159-197, 2001. ISSN 0165-5752.

LITTLEWOOD, D. T. J.; OLSON, P. D. Small subunit rDNA and the platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. In: LITTLEWOOD, D. T. J. e BRAY, R. A. (Ed.). **Interrelationships of the Platyhelminthes**. London: Taylor & Francis 2001. p.380.

LITTLEWOOD, D. T. J.; WAESCHENBACH, A.; NIKOLOV, P. N. In search of mitochondrial markers for resolving the phylogeny of cyclophyllidean tapeworms (Platyhelminthes, Cestoda)—a test study with Davaineidae. **Acta Parasitologica**, v. 53, n. 2, p. 133-144, 2008. ISSN 1230-2821.

LOPES, L. P. C.; VARELLA, A. M. B.; MALTA, J. C. O. Metazoan parasites of *Pseudoplatystoma punctifer* (Linnaeus, 1766) and *Pseudoplatystoma tigrinum* (Spix & Agassiz, 1829) Siluriformes: Pimelodidae) of the Central Amazon Basin, Brazil. **Biologia Geral e Experimental** v. 9, n. 2, p. 3-15, 2009.

MENDLOVÁ, M.; DESDEVISES, Y.; CIVÁŇOVÁ, K.; PARISELLE, A.; ŠIMKOVÁ, A. Monogeneans of West African cichlid fish: evolution and cophylogenetic interactions. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37268, 2012. ISSN 1932-6203.

MENDLOVÁ, M.; PARISELLE, A.; VYSKOČILOVA, M.; ŠIMKOVÁ, A. Molecular phylogeny of monogeneans parasitizing African freshwater Cichlidae inferred from LSU rDNA sequences. **Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1405–13, Nov 2010. ISSN 1432-1955 (Electronic) 0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697913> >.

MENDOZA-FRANCO, E. F.; REYES-LIZAMA, C.; GONZÁLEZ-SOLÍS, D. *Haliotrematoides* spp.(Monogenea: Dactylogyridae) infecting the gills of grunts (Perciformes: Haemulidae) from the southern coast of Quintana Roo, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 6, p. 1360–1363, 2009. ISSN 0022-3395.

MENDOZA-FRANCO, E. F.; SCHOLZ, T. New dactylogyrids (Monogenea) parasitizing the gills of catfishes (Siluriformes) from the Amazon River basin in Peru. **Journal of Parasitology** v. 95, n. 4, p. 865–870, Aug 2009. ISSN 1937-2345 (Electronic) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19215149> >.

MENDOZA-FRANCO, E. F.; SCHOLZ, T.; VIVAS-RODRÍGUEZ, C.; VARGAS-VÁZQUEZ, J. Monogeneans of freshwater fishes from cenotes (sinkholes) of the Yucatan Peninsula, Mexico. **Folia Parasitologica**, v. 46, n. 4, p. 267–273, 1999. ISSN 0015-5683.

MENDOZA-PALMERO, C. A.; BLASCO-COSTA, I.; SCHOLZ, T. Molecular phylogeny of Neotropical monogeneans (Platyhelminthes: Monogenea) from catfishes (Siluriformes). **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 164, p. 1–11, 2015. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25890068> >.

MENDOZA-PALMERO, C. A.; SCHOLZ, T. New species of *Demidospermus* (Monogenea: Dactylogyridae) of pimelodid catfish (Siluriformes) from Peruvian Amazonia and the reassignment of *Urocleidoides lebedevi* Kritsky and Thatcher, 1976. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 586–592, Aug 2011. ISSN 1937-2345 (Electronic) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21506840> >.

MENDOZA-PALMERO, C. A.; SCHOLZ, T.; MENDOZA-FRANCO, E. F.; KUCHTA, R. New species and geographical records of dactylogyrids (Monogenea) of catfish (Siluriformes) from the Peruvian Amazonia. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 3, p. 484–497, 2012. ISSN 0022-3395.

MIZELLE, J.; PRICE, C. Studies on monogenetic trematodes. XXVII. Dactylogyrid species with the proposal of *Urocleidoides* gen. n. **The Journal of parasitology**, p. 579-584, 1964. ISSN 0022-3395.

MIZELLE, J. D. New species of trematodes from the gills of Illinois fishes. **American Midland Naturalist**, v. 17, n. 5, p. 785-806, 1936. ISSN 0003-0031.

MIZELLE, J. D.; KRITSKY, D. C. *Unilatus* gen. n., a unique neotropical genus of Monogenea. **Journal of Parasitology**, v. 53, n. 5, p. 1113–1114, 1967. ISSN 0022-3395.

MIZELLE, J. D.; KRITSKY, D. C. Studies on Monogenetic Trematodes. XXXIX. Exotic Species of Monopisthocotylea with the Proposal of *Archidiplectanum* gen. n. and *Longihaptor* gen. n. **American Midland Naturalist**, p. 370–386, 1969. ISSN 0003-0031.

MIZELLE, J. D.; REGENSBERGER, R. Studies on Monogenetic Trematodes XII. Dactylogyridae from Wisconsin Fishes. **The American Midland Naturalist**, v. 34, n. 3, p. 673–700, 1945. ISSN 0003-0031.

MONTEIRO, C. M.; BRASIL-SATO, M. C. A new species of *Anacanthoroides* and redescription of *Apedunculata discoidea* (Monogenoidea) parasitizing *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii) from the São Francisco River, Brazil. **Zootaxa**, v. 3784, n. 3, p. 259-266, 2014. ISSN 1175-5334.

MONTEIRO, C. M.; KRITSKY, D. C.; BRASIL-SATO, M. C. Neotropical monogenoidea. 55. Dactylogyrids parasitising the pintado-amarelo *Pimelodus maculatus* Lacepede (Actinopterygii: Pimelodidae) from the Rio São Francisco, Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 179-190, Jul 2010. ISSN 1573-5192 (Electronic) 0165-5752 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532849> >.

NARCISO, R. B.; BRANDÃO, H.; YAMADA, F. H.; BENINE, R. C.; DA SILVA, R. J. A new species of *Trinibaculum* (Monogenea: Dactylogyridae) parasite of the gills of *Astyanax fasciatus*

(Cuvier, 1819)(Characiformes: Characidae) in a neotropical river, São Paulo state, Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 8, n. 1, p. 85–95, 2014. ISSN 1995-1043.

NETO, J. F. S.; RODRIGUES, A. R.; DOMINGUES, M. V. Proposal of Whittingtonocotyle n. gen.(Dactylogyroidea: Dactylogyridae), with the description of two new species from the gills of *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes: Erythrinidae) in Brazil. **Zootaxa**, v. 3937, n. 1, p. 191-200, 2015. ISSN 1175-5334.

PLAISANCE, L.; LITTLEWOOD, D. T. J.; OLSON, P. D.; MORAND, S. Molecular phylogeny of gill monogeneans (Platyhelminthes, Monogenea, Dactylogyridae) and colonization of Indo-West Pacific butterflyfish hosts (Perciformes, Chaetodontidae). **Zoologica Scripta**, v. 34, n. 4, p. 425–436, 2005. ISSN 0300-3256 1463-6409.

ROSIM, D. F.; MENDOZA-FRANCO, E. F.; LUQUE, J. L. New and previously described species of *Urocleidoides* (Monogeneoidea: Dactylogyridae) infecting the gills and nasal cavities of *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 3, p. 406–417, 2011.

ŠIMKOVÁ, A.; MATEJUSOVA, I.; CUNNINGHAM, C. O. A molecular phylogeny of the Dactylogyridae sensu Kritsky & Boeger (1989) (Monogenea) based on the D1-D3 domains of large subunit rDNA. **Parasitology**, v. 133, n. Pt 1, p. 43–53, Jul 2006. ISSN 0031-1820 (Print) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16515727> >.

ŠIMKOVÁ, A.; MORAND, S.; JOBET, E.; GELNAR, M.; VERNEAU, O.; POULIN, R. Molecular phylogeny of congeneric monogenean parasites (*Dactylogyrus*): a case of intrahost speciation. **Evolution**, v. 58, n. 5, p. 1001–1018, 2004. ISSN 1558-5646.

ŠIMKOVÁ, A.; PLAISANCE, L.; MATĚJUSOVÁ, I.; MORAND, S.; VERNEAU, O. Phylogenetic relationships of the Dactylogyridae Bychowsky, 1933 (Monogenea: Dactylogyridea): the need for the systematic revision of the Ancyrocephalinae Bychowsky, 1937. **Systematic Parasitology**, v. 54, p. 1–11, 2003.

ŠIMKOVÁ, A.; VERNEAU, O.; GELNAR, M.; MORAND, S. Specificity and Specialization of Congeneric Monogeneans Parasitizing Cyprinid Fish. **Evolution**, v. 60, n. 5, p. 1023–1037, 2006. ISSN 0014-3820.

SINNAPPAH, N. D.; LIM, L. H.; ROHDE, K.; TINSLEY, R.; COMBES, C.; VERNEAU, O. A paedomorphic parasite associated with a neotenic amphibian host: phylogenetic evidence suggests a revised systematic position for Sphyrnauridae within anuran and turtle Polystomatoineans. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 18, n. 2, p. 189–201, Feb 2001. ISSN 1055-7903 (Print) 1055-7903 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161755> >.

SURIANO, D. *Demidospermus anus* gen. nov. sp. nov. (Monogenea: Ancyrocephalinae) parásita branquial de *Loricaria* (L.) *anus* Valenciennes, 1840 (Pisces: Loricariidae) de la laguna de Chascomús, provincia de Buenos Aires, República Argentina. **Neotropica**. **29 (82)**. **111-120**, v. 111, p. 120, 1983.

SURIANO, D.; INCORVAIA, I. Ancyrocephalid [Monogenea] parasites from siluriform fishes from the Paranean-Platanian ichthyogeographical province in Argentina. **Acta Parasitologica**, v. 40, n. 3, 1995. ISSN 1230-2821.

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, v. 56, p. 564–577, 2007. ISSN 1063-5157.

WHITTINGTON, I. D.; CHISHOLM, L. A. Diseases Caused By Monogenea. In: EIRAS, J.; SEGNER, H., *et al* (Ed.). **Fish Diseases, Vol. 1 and 2** Enfield, Jersey, Plymouth: Science Publishers, 2008. p.683 - 816. ISBN 1578084385.

WU, X.-Y.; ZHU, X. Q.; XIE, M. Q.; LI, A. X. The radiation of *Haliotrema* (Monogenea: Dactylogyridae: Ancyrocephalinae): molecular evidence and explanation inferred from LSU rDNA

sequences. **Parasitology**, v. 132, n. Pt 5, p. 659–668, May 2006. ISSN 0031-1820 (Print) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16398949> >.

YAMADA, F.; BRANDÃO, H.; YAMADA, P.; DA SILVA, R. *Philocorydoras longus* sp. n. (Monogenea, Dactylogyridae) from the gills of *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae) in Southeastern Brazil and the reassignment of two species from the genus *Urocleidoides* to *Philocorydoras*. **Helminthologia**, v. 52, n. 4, p. 331–335, 2015. ISSN 1336-9083.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dactilogirídeos são provavelmente o grupo de helmintos mais especioso do planeta. A miríade de processos evolutivos que conduziram esse grupo de helmintos ao que se denomina uma radiação adaptativa, começa agora a ser elucidada. Parte desse processo é decorrente das recentes propostas filogenéticas com base em dados moleculares. As propostas apresentadas aqui, referentes à descrição de uma nova espécie de *Pavanelliella*; à descrição de uma nova espécie de *Ameloblastella*; à descrição de uma nova espécie de *Demidospermus*; à transferência de outras duas antes *incertae sedis* para o gênero *Demidospermus*; à proposição de um novo gênero, foram baseadas em estudos morfológicos e inferências filogenéticas baseadas no sequenciamento dos genes 18S rDNA, ITS1 e 28S rDNA. Contudo elas representam hipóteses evolutivas e como tal, estão sujeitas a alterações. Recentemente, a monofilia de *Demidospermus* foi contestada mediante uma hipótese filogenética baseada no gene 28S rDNA, ao que atribuímos a fragilidade de nossas propostas relacionadas a *Demidospermus*. Esse gênero tem se tornado o que se conhece como “cesta de lixo”, na qual tudo é ali depositado. Portanto dentro desse gênero, provavelmente estão inclusos membros de linhagens distintas, ou que foram descritas como pertencentes ao gênero, ou que foram transferidas posteriormente. Contudo, está longe de nossos objetivos solucionar todos os problemas referentes a sistemática de dactilogirídeos, ou mais modestamente, de dactilogirídeos parasitas de siluriformes neotropicais. No entanto, os resultados alcançados no presente estudo certamente contribuirão criticamente para o desenvolvimento de estudos futuros, principalmente no que tange à delimitação de caracteres morfológicos e à sistemática filogenética molecular de dactilogirídeos parasitas de siluriformes.

10. CONCLUSÕES

10.1 Mesmo hospedeiros já examinados anteriormente, de grande porte, podem reservar uma fauna desconhecida de dactilogirídeos;

10.2 É possível inferir filogenia de Dactylogyridae com base nos marcadores 18S, ITS1 e 28S, uma vez que as diferenças observadas entre as topologias apresentadas são decorrentes dos táxons amostrados e do grupo externo usado para enraizar e não diferem significativamente;

10.3 A história evolutiva de Dactylogyridae é bastante complexa e, além dos eventos de co-especiação e especiação simpátrica intra-hospedeiro, envolve colonização secundária de ambientes marinhos, colonização por invasão secundária de ambientes de água doce e eventos independentes de colonização de hospedeiros filogeneticamente próximos, por meio de troca de hospedeiros, a partir de hospedeiros filogeneticamente distantes.

11. ANEXOS

ANEXO I

CEUA/UNICAMP



CEUA/Unicamp

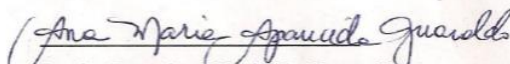
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

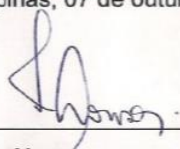
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Taxonomia e sistemática molecular de Monogenoidea (Platyhelminthes: Cercomeromorpha) parasitos de quatro espécies de peixes da família Pimelodidae (Siluriformes) oriundos do rio Tapajós, PA" (protocolo nº 3179-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano / Julio Cesar Cenci de Aguiar, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de outubro de 2013.

Campinas, 07 de outubro de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO II

SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42427-3	Data da Emissão: 07/01/2016 16:22	Data para Revalidação*: 05/02/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Julio Cesar Cenci de Aguiar	CPF: 302.383.068-10
Título do Projeto: Taxonomia e sistemática molecular de Monogeneoidea (Platyhelminthes: Cercomeromorpha) parasitos de quatro espécies de peixes da família Pimelodidae (Siluriformes) oriundos do rio Tapajós, PA	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Transporte de material para processamento em laboratórios especializados	02/2014	12/2016
2	Coleta	05/2014	12/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Antonio Augusto Mendes Maia	Análises Moleculares	322.324.706-67	M-1 414530 ssp-MG	Brasileira
2	EDSON APARECIDO ADRIANO	Orientador	080.457.968-71	18015128-9 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SANTAREM	PA	Rio Tapajós	Fora de UC Federal
2		AM	PARQUE NACIONAL DA AMAZÔNIA	UC Federal
3	PORTO NACIONAL	TO	Rio Tocantins	Fora de UC Federal
4	PIRASSUNUNGA	SP	Rio Mogi Guaçu	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 92454251



Página 1/4

ANEXO III

MATERIAL TIPO CONSULTADO

BRASIL

Demidospermus labrosi (= *Demidospermus cornicinus* Kritsky & Gutiérrez, 1998) França, Isaac, Pavanelli & Takemoto, 2003

Hospedeiro: *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874)

Localidade tipo: Brazil, Paraná, Rio Paraná, Baia, Lagoa dos Patos

Holótipo: CHIOC 34594a; Parátipos: 34587 (a-c), 34594 (b-c), 34595, 34596, 34597

Demidospermus mandi (= *Demidospermus leptosynophallus* Kritsky & Gutierrez, 1998) França, Isaac, Pavanelli & Takemoto, 2003

Hospedeiro: *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874)

Localidade tipo: Brazil, Paraná, Rio Paraná, Baia, Lagoa dos Patos

Holótipo: CHIOC 34586a; Parátipos: CHIOC 34586b, CHIOC 34593 (a-b), 34591, 34592, 34589, 34590

Demidospermus paranaensis Ferrari-Hoeinghaus, Bellay, Takemoto e Pavanelli, 2010

Hospedeiro: *Loricariichthys platymetopon* Isbrücker & Nijssen, 1979

Localidade tipo: Brazil, Upper Paraná River

Holótipo: CHIOC 37255a; Parátipos: CHIOC 37255b-e

Demidospermus araguaiaensis Cepeda e Luque 2010

Hospedeiro: *Brachyplatystoma filamentosum* (Lichtenstein, 1819)

Localidade tipo: Brazil, Rio Araguaia, Mato Grosso state

Holótipo: CHIOC 37326; Paratype: CHIOC 37327

Demidospermus brachyplatystomae Cepeda e Luque 2010

Hospedeiro: *Brachyplatystoma filamentosum* (Lichtenstein, 1819)

Localidade tipo: Brazil, Rio Araguaia, Mato Grosso state

Holótipo: CHIOC 37320; Parátipos: CHIOC 37321 a–b, 37322 a–d

Demidospermus ceccarellii Cepeda e Luque 2010

Hospedeiro: *Brachyplatystoma filamentosum* (Lichtenstein, 1819)

Localidade tipo: Brazil, Rio Araguaia, Mato Grosso state

Holótipo: CHIOC 37323; Parátipos: CHIOC 37324 a–d, 37325 a–e

Pseudovancleaveus (= *Ameloblastella*) *paranaensis* (França, Isaac, Pavanelli & Takemoto, 2003)

Hospedeiro: *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874)

Parátipos: CHIOC 34588a–d

Urocleidoides (= *Demidospermus*) *lebedevi* (Kritsky & Thatcher, 1976)

Hospedeiro: *Pimelodus grosskopfii* Steindachner, 1879

Localidade tipo: Colombia, Rio Cauca, Juanchito, Valle, Cali

Parátipo: CHIOC 31222

Cosmetocleithrum gussevi Kritsky, Thatcher & Boeger, 1986

Hospedeiro: *Oxydoras niger* (Valenciennes, 1821)

Localidade tipo: Brazil, Amazonas, Lago Janauaca

Holótipo: INPA-PA 266-1; Parátipos: INPA PA 266-2, INPA 158b

Cosmetocleithrum striatuli Abdallah, Azevedo & Luque, 2012

Hospedeiro: *Trachelyopterus striatulus* (Steindachner, 1877)

Localidade tipo: Brazil, Guandu river, Rio de Janeiro

Holótipo: INPA 532; paratype: 533 a–c

Demidospermus ichthyocercus Monteiro, Kritsky e Brasil-Sato, 2010

Hospedeiro: *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803

Localidade tipo: São Francisco River – MG

Holótipo: INPA 516; 18 Parátipos: INPA 517a–i

Vancleaveus janauacaensis Kritsky, Thatcher & Boeger, 1986

Hospedeiro: *Pterodoras granulosus* (Valenciennes, 1821)

Brazil, Amazonas, Lago Janauaca

Holótipo: INPA PA 262-1; Parátipos: INPA 262-2, INPA 262-3

ESTADOS UNIDOS

Ameloblastella chavarriai

Hospedeiro: *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)

Localidade: Trinidad and Tobago, Trinidad, Cumuto River near Coryal

Voucher: USNM 1368745 (2 slides)

Localidade: Mexico, Yucatan, Ixin-Ha Cenote

Voucher: USNM 1384158 (5 slides)

Ameloblastella unapi

Hospedeiro tipo: *Calophysus macropterus* (Lichtenstein, 1819)

Localidade tipo: Peru, Loreto, Iquitos, UNAP Exper Fish Farm

Holótipo: USNM 1396529 Parátipos: USNM 1396530 (2 slides)

Aphanoblastella aurorae

Hospedeiro: *Goeldiella eques* (Müller & Troschel, 1849)

Localidade tipo: Peru Loreto Iquitos, Santa Clara

Parátipos: USNM 1400341 (1 slide), USNM 1400342 (2 slides), USNM 1400343 (2 slides)

Aphanoblastella travassosi

Hospedeiro: *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)

Localidade: Trinidad and Tobago, Trinidad, Cumuto River near Coryal

Voucher: USNM 1368746 (3 slides)

Localidade: Mexico, Yucatan, Ixin-Ha Cenote

Voucher: USNM 1384159 (6 slides)

Demidospermus anus

Hospedeiro: *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835)

Localidade: Argentina, Buenos Aires, Chascomus

Voucher: USNM 1382363 (3 slides)

Demidospermus armostus

Hospedeiro tipo: *Syndontis clarias* (*Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803)

Localidade tipo: Argentina, Buenos Aires, Rio de La Plata

Holótipo: USNM 1382347 Parátipos: USNM 1382348 (6 slides)

Demidospermus bidiverticulatum

Hospedeiro: *Syndontis clarias* (*Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803)

Localidade: Argentina, Buenos Aires, Rio de La Plata

Voucher: USNM 1382350 (3 slides)

Hospedeiro: *Pimelodus albicans* (Valenciennes, 1840)

Voucher: USNM 1382351 (3 slides)

Demidospermus brevicirrus

Hospedeiro tipo: *Pimelodus* sp.

Localidade tipo: Peru, Loreto, Iquitos, Santa Clara

Parátipos: USNM 1400335 (1 slide), USNM 1400336 (3 slides), USNM 1400337 (1 slide), USNM 1400338 (2 slides)

Demidospermus centromochli

Hospedeiro tipo: *Centromochlus heckelii* (De Filippi, 1853)

Localidade tipo: Peru, Loreto, Iquitos

Holótipo + Parátipo: USNM 1396527 (1 slide) Parátipo: USNM 1396528 (1 slide)

Demidospermus cornicinus

Hospedeiro tipo: *Bergiaria westermanni* (Lütken, 1874)

Localidade tipo: Argentina, Buenos Aires, Rio de La Plata
 Holótipo: USNM 1382359 Parátipos: USNM 1382360 (4 slides)

Demidospermus curvovaginatus

Hospedeiro tipo: *Pimelodus* sp.
 Localidade tipo: Peru, Loreto, Iquitos
 Parátipo: USNM 1399527 (1 slide)
 Voucher: USNM 1399528 (2 slides)
 Localidade: Peru, Santa Clara
 Voucher: USNM 1399529 (1 slide)

Demidospermus ichthyocercus

Hospedeiro tipo: *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803
 Localidade tipo: Brazil, Minas Gerais
 Parátipo: USNM 1397347 (6 slides)

Demidospermus idolus

Hospedeiro tipo: *Pimelodus albicans* (Valenciennes, 1840)
 Localidade tipo: Argentina, Buenos Aires, Rio de La Plata
 Holótipo: USNM 1382355 (1 slide) Parátipos: USNM 1382356 (4 slides)

Demidospermus leptosynophallus

Hospedeiro tipo: *Bergiaria westermanni* (Lütken, 1874)
 Localidade tipo: Argentina, Buenos Aires, Rio de La Plata
 Holótipo: USNM 1382353 Parátipos: USNM 1382354 (4 slides)

Demidospermus macropteri

Hospedeiro tipo: *Calophysus macropterus* (Lichtenstein, 1819)
 Localidade tipo: Peru, Loreto, Iquitos, UNAP Exper Fish Farm
 Holótipo: USNM 1396531 Parátipos: USNM 1396532 (2 slides)

Demidospermus majusculus

Hospedeiro tipo: *Pimelodus albicans* (Valenciennes, 1840)

Localidade tipo: Argentina, Buenos Aires, Rio de La Plata

Holótipo: USNM 1382357 Parátipos: USNM 1382358 (5 slides)

Demidospermus mortenthaleri

Hospedeiro tipo: *Brachyplatystoma juruense* (Boulenger, 1898)

Localidade tipo: Peru, Loreto, Iquitos, Santa Clara de Nanay

Parátipos: USNM 1400329 (1 slide), USNM 1400330 (1 slide), USNM 1400331 (2 slides)

Demidospermus paravalenciennesi

Hospedeiro: Syndontis clarias (*Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803)

Localidade: Argentina, Buenos Aires, Rio de La Plata

Voucher: USNM 1382349 (3 slides)

Localidade: Brazil, Minas Gerais

Voucher: USNM 1397353 (3 slides)

Demidospermus peruvianus

Hospedeiro tipo: *Pimelodus ornatus* Kner, 1858

Localidade tipo: Peru, Loreto, Iquitos

Parátipos: USNM 1399524 (2 slides)

Hospedeiro: *Pimelodus* sp.

Voucher: USNM 1399525 (1 slide), USNM 1399526 (1 slide)

Demidospermus striatus

Hospedeiro tipo: *Pimelodus* sp.

Localidade tipo: Peru, Loreto, Iquitos

Parátipos: USNM 1399530 (2 slides)

Voucher: USNM 1399531 (2 slides)

Demidospermus uncusvalidus

Hospedeiro: *Syndontis clarias* (*Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803)

Localidade: Argentina, Buenos Aires, Rio de La Plata

Voucher: USNM 1382352 (3 slides)

Localidade: Brazil, Minas Gerais

Voucher: USNM 1397354 (3 slides)

Demidospermus valenciennesi

Hospedeiro: *Parapimelodus valenciennis* (Lütken, 1874)

Localidade: Argentina, Buenos Aires, Rio de La Plata

Voucher: USNM 1382361 (10 slides)

Urocleidoides lebedevi

Hospedeiro tipo: *Pimelodus grosskopfii* Steindachner, 1879

Localidade tipo: Colombia, Valle, Rio Cauca

Holótipo: USNM 1368845 Parátipos: USNM 1368846 (3 slides)

Localidade: Colombia, Cali, Valle, Rio Frio near Tulua

Parátipos: USNM 1368847 (3 slides)

Urocleidoides megorchis

Hospedeiro tipo: *Sorubim lima* (Bloch & Schneider, 1801)

Localidade tipo: Brazil, Amazon River Basin

Holótipo: USNM 1366584

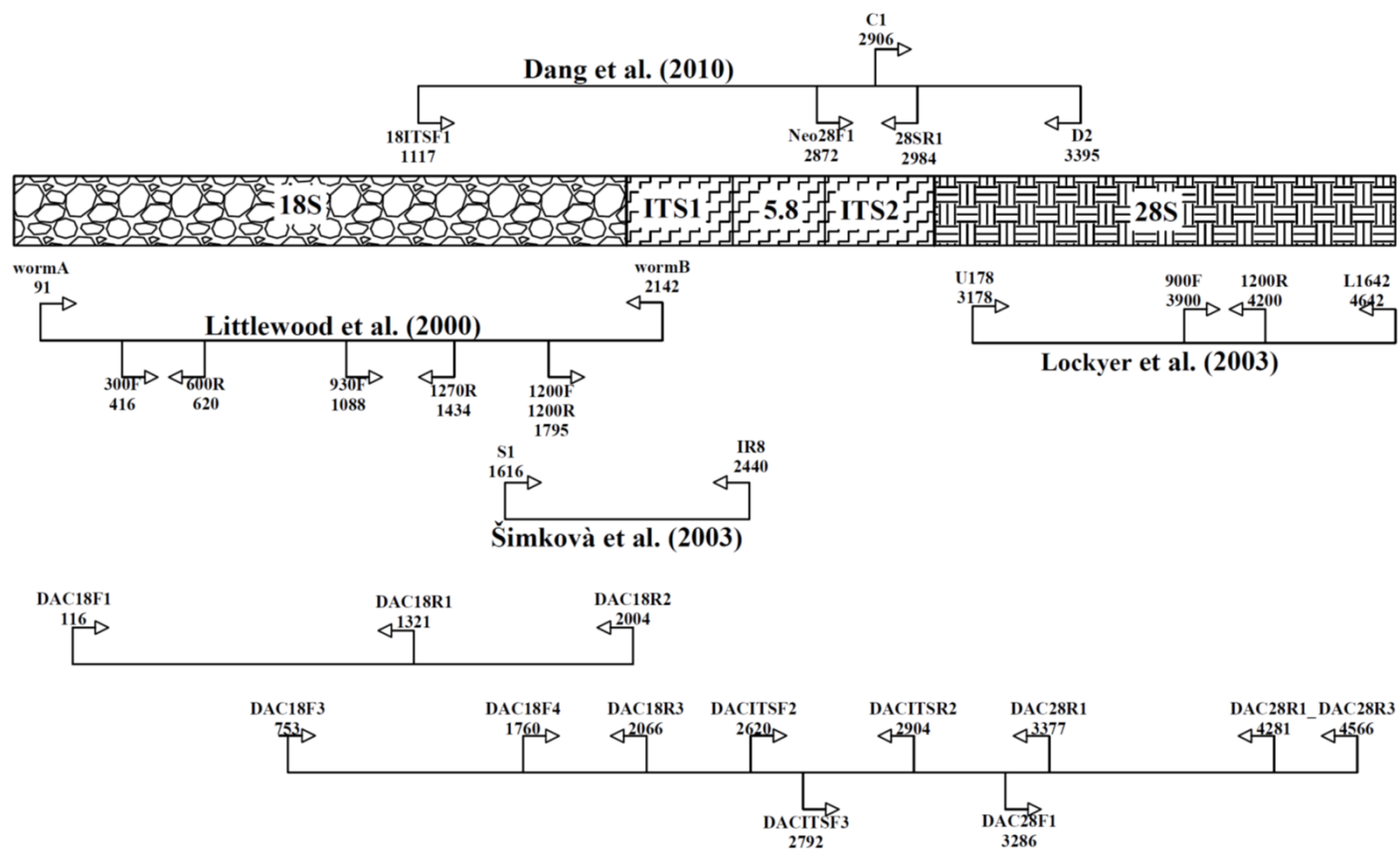
Vancleaveus janauacaensis

Hospedeiro: *Pterodoras granulosus* (Valenciennes, 1821)

Localidade: Peru, Loreto, Iquitos, Itaya River

Voucher: USNM 1400353 (6 slides), USNM 1400354 (1 slide)

ANEXO IV

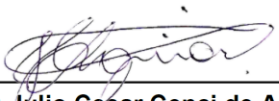
MAPA DE GENES COM SUPOSTO POSICIONAMENTO DE *PRIMERS*


ANEXO V

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **SISTEMÁTICA DE DACTILOGIRÍDEOS (PLATYHELMINTHES, MONOGENOIDEA) PARASITAS DE PEIXES DA FAMÍLIA PIMELODIDAE DAS BACIAS DOS RIOS AMAZONAS E PARANÁ, BRASIL**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20 de outubro de 2017

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Julio Cesar Cenci de Aguiar**
RG n.º 352952908

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Edson Aparecido Adriano**
RG n.º 180151289